

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



TESIS DOCTORAL

Metabolismo del glutatión y enzimas antioxidantes frente al estrés por metal(oid)es y otros agentes, en el ciliado-modelo "*Tetrahymena thermophila*"

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
PRESENTADA POR**

Ruth Ortega Herrero

Directores

Juan Carlos Gutiérrez Fernández
Ana Martín-González

Madrid, 2015

Metabolismo del Glutathión y enzimas antioxidantes frente al estrés por metal(oid)es y otros agentes, en el ciliado-modelo *Tetrahymena thermophila*.



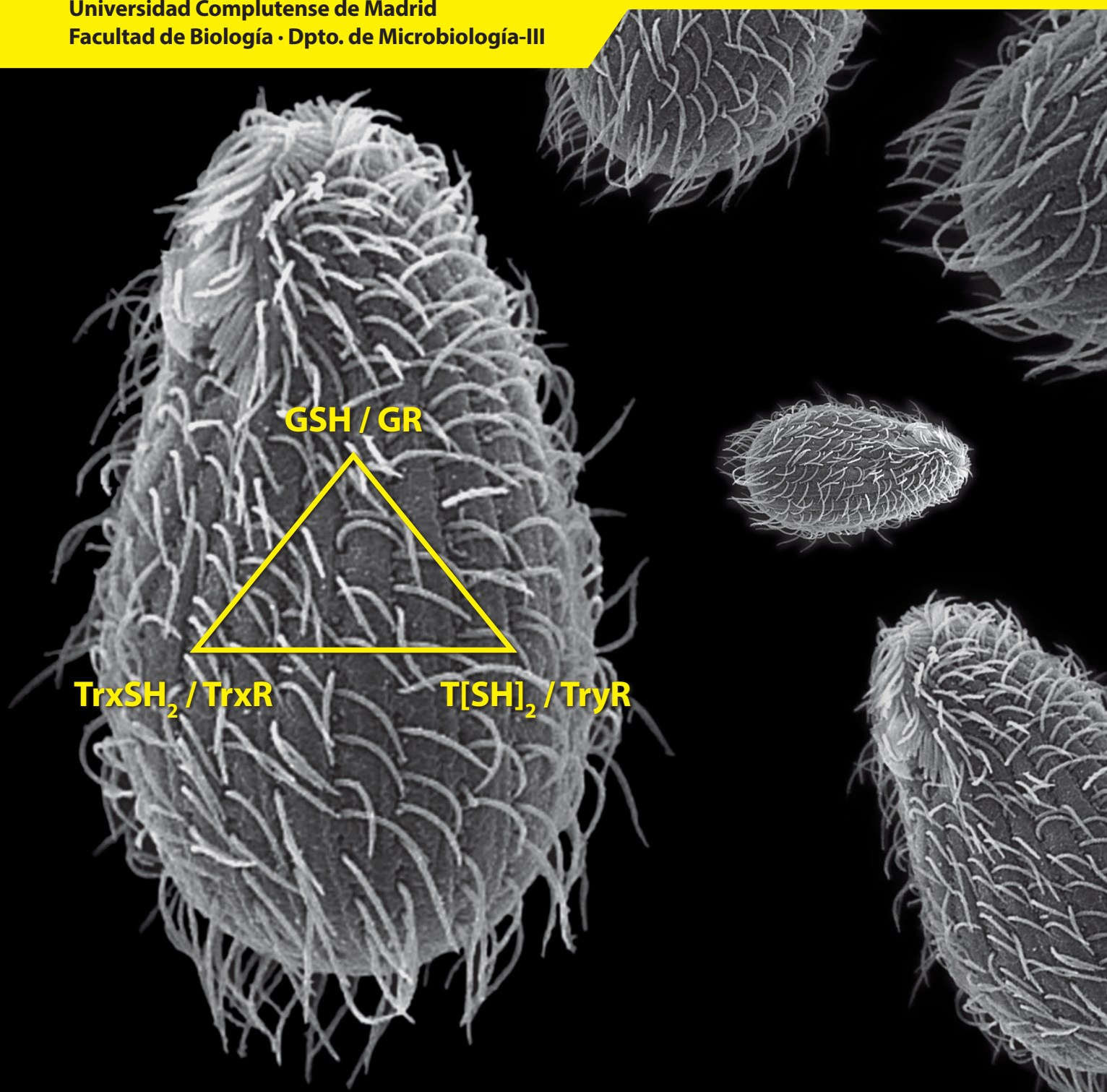
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

RUTH ORTEGA HERRERO
Madrid, 2015

TESIS DOCTORAL

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Biología · Dpto. de Microbiología-III



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología III



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

**Metabolismo del Glutathión y enzimas antioxidantes
frente al estrés por metal(oid)es y otros agentes, en
el ciliado-modelo *Tetrahymena thermophila*.**

Memoria que para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas presenta
Doña Ruth Ortega Herrero

Vº Bº de los Directores

La Doctoranda

Dr. Juan Carlos Gutiérrrez Fernández

Dra. Ana Martín-González

Ruth Ortega Herrero

Madrid, 2015

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología III



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

**Metabolismo del Glutathión y enzimas antioxidantes
frente al estrés por metal(oid)es y otros agentes, en
el ciliado-modelo *Tetrahymena thermophila*.**

Memoria que para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas presenta
Doña Ruth Ortega Herrero

Madrid, 2015

Financiación

El presente trabajo de tesis doctoral fue financiado por el proyecto de investigación:

*“El ciliado-modelo *Tetrahymena thermophila* como herramienta celular para el estudio de las interacciones “metal pesado-célula eucariota”: elementos involucrados en la expresión de genes de metalotioneinas, validación de biosensores-celulares, metabolismo del glutathione, muerte celular programada (apoptosis-autofagia)”. Entidad financiadora: MCI. Referencia: CGL2008-00317/BOS.*

Investigador Principal: Dr. Juan Carlos Gutiérrez. (Dpto. Microbiología-III. Facultad de Biología. UCM).

Agradecimientos

Este trabajo es el fruto de muchas personas a las cuales me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de Tesis, el Dr. Juan Carlos Gutiérrez y la Dra. Ana Martín-González, por introducirme en la labor investigadora, por su accesibilidad y su continuo apoyo.

De igual forma quiero agradecer los ánimos recibidos por todo el personal del Departamento de Microbiología III y su ayuda incondicional, por prestarme tanto la orientación como los medios que necesité en el desarrollo de este estudio.

Mi gratitud también al Dr. Alan Fairlamb del College of Life Sciences, University of Dundee, que me acogió en su equipo y en especial a la Dra. Sandra Oza que supervisó mi estancia.

Gracias a mis compis de carrera por escucharme cuando lo veía todo negro, gracias a Bárbara, a María, a Irene y a Janeth.

Y gracias al cuadrado a mis compañeros de laboratorio y no sólo por el apoyo en este trabajo, principalmente gracias por hacerme reír y llorar a la vez. Gracias a Silvia por ser mi guía en todos los sentidos, sin tu consejo estoy perdida. Gracias a Pili por estar siempre ahí, pase lo que pase. Y gracias a Paco por hacerme sentir especial. Os admiro tanto...

Y no tengo palabras para expresar lo que le debo a mi familia. A mis padres, Presen y Juan, por dejarme equivocarme constantemente y apoyarme en todas mis locas aventuras, incluyendo este momento. Y a mi hermana Esther, por aguantar mi mal humor cuando le pedía ayuda para la realización de este trabajo. Este trabajo es más vuestro que mío.

Índice

Abreviaturas	17
Summary	23
Introducción	39
<u>1. ESTRÉS OXIDATIVO</u>	41
<u>2. INDUCTORES EXÓGENOS DE ESTRÉS OXIDATIVO</u>	45
2.1 Metales pesados y metaloides	46
2.1.1 Cadmio	48
2.1.2 Arsénico	48
2.1.3 Cobre	49
2.1.4 Zinc	49
2.1.5 Plomo	50
2.2 Herbicidas: Paraquat	50
2.3 Quinonas: Menadiona	51
2.4 Dinitrohalobencenos: CDNB	51
<u>3. DEFENSAS ANTIOXIDANTES</u>	52
3.1 Sistema antioxidante dependiente de glutatión	55
3.1.1 Glutatión	55
3.1.2 Biosíntesis de glutatión	57
3.1.1.2.1 Glutamato cisteína ligasa	58
3.1.1.2.2 Glutatión sintetasa	61
3.1.1.2.3 Fusión glutamato cisteína ligasa-glutatión sintasa	62
3.1.2 Glutatión reductasa	62
3.1.3 Glutatión transferasas	63
3.1.3.1 GSTs citosólicas	64

3.1.3.2 GSTs mitocondriales	67
3.1.3.3 GSTs microsomales o MAPEG.....	68
3.1.3.4 GSTs FosA	68
3.1.3.5 Evolución y expresión de las GSTs.....	69
3.1.4 Glutación peroxidasas	71
3.1.5 Glutarredoxinas.....	71
3.2 Sistema antioxidante dependiente de tiorredoxina	72
3.2.1 Tiorredoxina.....	72
3.2.2 Tiorredoxina reductasa.....	74
3.2.2.1 Tiorredoxinas reductasas de alto peso molecular	75
3.2.2.2 Tiorredoxinas reductasas de bajo peso molecular	77
3.3 Sistema antioxidante dependiente de tripanotión.....	77
3.3.1 Tripanotión.....	77
3.3.2 Biosíntesis de tripanotión.....	78
3.3.3 Tripanotión reductasas	80

Objetivos	83
------------------------	-----------

Materiales y Métodos.....	87
----------------------------------	-----------

MATERIALES.....	89
------------------------	-----------

<u>1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO</u>	89
--	-----------

1.1 Microorganismo eucariota	89
------------------------------------	----

1.2 Microorganismo procariota: estirpe bacteriana utilizada para la clonación	89
---	----

<u>2. MEDIOS DE CULTIVO</u>	90
--	-----------

<u>3. SOLUCIONES Y TAMPONES</u>	90
--	-----------

<u>4. TRATAMIENTOS.....</u>	92
------------------------------------	-----------

MÉTODOS.....	93
---------------------	-----------

<u>5. ESTUDIO DEL CONTENIDO TIÓLICO EN <i>Tetrahymena thermophila</i></u>	93
--	-----------

5.1 Determinación de GSH por citometría de flujo	93
--	----

5.2 Determinación enzimática de GSH	97
---	----

<u>6. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES CODIFICANTES DE ENZIMAS</u>	
---	--

<u>ANTIOXIDANTES</u>	98
-----------------------------------	-----------

6.1 Obtención de las secuencias de genes y análisis <i>in silico</i>	98
--	----

6.2 Análisis de la expresión	100
------------------------------------	-----

6.2.1 Tratamientos	100
--------------------------	-----

6.2.2 Aislamiento ARN total	101
6.2.3 Síntesis de ADN complementario.....	102
6.2.4 RT-PCR a tiempo real	102
6.2.5 Comprobación de los genes amplificados	107
6.2.5.1 Clonación y transformación	108
6.2.5.2 Aislamiento de los plásmidos y detección de los insertos clonados	108
7. MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS	109
7.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	109
7.2 Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes de agarosa	109
8. DETERMINACIÓN DE TIOLES DE BAJO PESO MOLECULAR POR HPLC	110
8.1 Preparación de las muestras y separación por cromatografía	110
8.2 Determinación de los pesos moleculares por espectrometría de masas	111
9. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS GR, TryR Y TryS	111
9.1 Obtención del extracto celular de <i>Tetrahymena thermophila</i>	111
9.2 Determinación de la actividad glutatión reductasa y tripanotión reductasa	111
9.3 Determinación de la actividad tripanotión sintetasa	112
Resultados.....	115
1. RELEVANCIA DE LAS MOLÉCULAS CON GRUPOS TIÓLICOS EN LA RESPUESTA-ESTRÉS A METALES PESADOS Y OTROS AGENTES ESTRESANTES EN EL CILIADO <i>Tetrahymena thermophila</i>	117
2. RELEVANCIA DEL GLUTATIÓN EN LA RESPUESTA ESTRÉS FRENTE A METALES PESADOS Y OTROS AGENTES ESTRESANTES EN EL CILIADO <i>T. thermophila</i>	137
2.1 Valoración enzimática de los niveles de glutatión total a lo largo de la curva de crecimiento de una población de <i>T. thermophila</i>	137
2.2 Valoración enzimática del glutatión en muestras tratadas con metales y agentes oxidantes	138
3. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN CODIFICANTE DE LA GLUTAMATO CISTEÍNA LIGASA (GCL) DE <i>T. thermophila</i>	149
4. ANÁLISIS <i>in silico</i> Y DE LA EXPRESIÓN DE GENES HOMÓLOGOS DE GLUTATIÓN S-TRANSFERASAS PRESENTES EN <i>T. thermophila</i>	151
4.1 Análisis <i>in silico</i>	151
4.2 Análisis de la expresión por RT-PCR cuantitativa de algunos genes <i>TtGSTs</i>	162

5. ANÁLISIS DE LOS GENES HOMÓLOGOS DE TIORREDOXINA REDUCTASA (TrxR) Y GLUTATIÓN REDUCTASAS (GR) DE <i>Tetrahymena thermophila</i>	172
5.1 Análisis <i>in silico</i>	172
5.2 Análisis de la expresión de genes <i>TtTrxRs</i> y <i>TtGR1</i> por RT-PCR cuantitativa	179
6. TRIPANOTIÓN SINTETASAS (TrySs)-GLUTATIONILES PERMIDINA SINTETASAS (GspSs) EN <i>Tetrahymena thermophila</i>	183
6.1 Análisis <i>in silico</i>	183
6.2 Análisis de la expresión de algunos genes <i>TtGspS</i>	186
7. BIOSÍNTESIS DE TRIPANOTIÓN T[SH]₂ EN <i>Tetrahymena thermophila</i>	189
7.1 Biosíntesis de T[SH] ₂ en extractos celulares	189
7.2 Biosíntesis de T[SH] ₂ <i>in vivo</i>	192
7.2.1 Biosíntesis de T[SH] ₂ durante el crecimiento	192
7.2.2 Biosíntesis de T[SH] ₂ bajo diferentes tratamientos inductores de la expresión del gen <i>TtGspS4</i>	193
7.3 Determinación por espectrometría de masas del pico denominado T[SH] ₂	195
8. RECICLAJE DE TRIPANOTIÓN: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA TRIPANOTIÓN REDUCTASA	195
Discusión	201
1. BIOTOXICIDAD DE METALES Y OTROS AGENTES ESTRESANTES. Efecto de la inhibición de la biosíntesis de GSH o bloqueo de grupos tiólicos. Valoración de la mortalidad celular/grupos tiólicos/glutación total	203
2. VALORACIÓN DE GLUTATIÓN TOTAL CELULAR (GSH/GSSG)	213
2.1 Determinación de glutatión total celular (GSH/GSSG) a lo largo de la curva de crecimiento	213
2.2 Determinación de glutatión total celular (GSH/GSSG) bajo el estrés por metales y otros agentes junto con la utilización de BSO o NEM	214
3. EL GEN DE LA GLUTAMATO CISTEÍNA LIGASA DE <i>T. thermophila</i> (TtGCL)	217
3.1 Sobre el origen de la TtGCL	221
3.2 Expresión del gen <i>TtGCL</i>	223
4. LA FAMILIA DE GSTs DE <i>T. thermophila</i>	228
4.1 Análisis comparativo de las características estructurales	230
4.2 Consideraciones filogenéticas e implicaciones de la presencia de GSTs de clase Mu en ciliados	236

4.3 Otras características destacables de algunas GSTs de <i>T. thermophila</i>	240
4.4 Sobre la inducción y niveles de expresión de los genes GSTs de <i>T. thermophila</i>	246
4.5 Expresión de genes GSTs analizada individualmente.....	252
4.6 Expresión de genes GSTs analizada en grupo	260
4.7 Consideraciones finales sobre la expresión de los genes GSTs de <i>T. thermophila</i>	262
5. TIORREDOXINA REDUCTASAS (TrxRs) Y GLUTATIÓN REDUCTASA (GR) DE <i>Tetrahymena thermophila</i>	265
5.1 Características de la ORF que contiene la TtTrxR5 de <i>T. thermophila</i>	271
5.2 La GR de <i>T. thermophila</i> (TtGR1)	275
5.3 Consideraciones filogenéticas y ecológicas sobre las TrxRs/GRs	277
5.4 Análisis comparativo de la expresión de los genes <i>TtTrxRs/TtGR1</i>	279
6. GENES SIMILARES A TRIPANOTIÓN (TryS) O GLUTATIONILESPERMIDINA (GspS) SINTETASAS EN <i>Tetrahymena thermophila</i>	287
6.1 Sobre la expresión de los genes <i>TtGspSs</i>	290
6.2 Presencia y biosíntesis de T[SH] ₂ en <i>T. thermophila</i>	294
6.3 Modelo evolutivo de las TryS/GspS.....	300
7. VISIÓN INTEGRADA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL Cd²⁺ y As⁵⁺: POSIBLES ESCENARIOS O MODELOS DE LA RESPUESTA ESTRÉS EN <i>Tetrahymena thermophila</i>	303
7.1 Posible escenario de la respuesta estrés frente al As ⁵⁺	305
7.2 Posible escenario de la respuesta estrés frente al Cd ²⁺	307
Resumen de resultados	309
Conclusiones	321
Bibliografía	325
Anexo I	367
Anexo II	373
Anexo III	399

Abreviaturas

3'UTR: región 3' no traducida (3' *UnTranslated Region*)

4-HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

5' UTR: región 5' no traducida (5' *UnTranslated Region*)

A: actividad

aa: aminoácido

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: adenosin difosfato

AMT: arseniato/arsenito metiltransferasa

ANDc: ADN complementario

AP-1: factor de transcripción AP-1 (*Activator protein 1*)

AR: arseniato reductasa

ARE: elemento de respuesta antioxidantes

ARN: ácido ribonucleico

ARNi: ARN de interferencia

ARNm: ARN mensajero

ARNt: ARN de transferencia

Asc: ascorbato

ATP: adenosin trifosfato

BSO: butionin sulfoximina

Abreviaturas

CAT: catalasa

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno

CLIC: canales intracelulares de cloro

CMFDA: diacetato de 5-clorometilfluoresceína

Ct: ciclo umbral

C-term o C-terminal: carboxilo terminal

DECP: dietil pirocarbonato

DHAR: dehidroascorbato reductasa

DIG: digoxigenina

DMA: dimetil-arseniato

DMSO: dimetil sulfóxido

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

DPTA: ácido dietilenetriamoniopentaacético

ds: desviación estándar

DTNB: ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico)

E: eficacia de amplificación

EDTA: etilendiaminotetra acético

eEF1B γ : factor de elongación de proteínas eucariotas

EPA: *US Enviromental Protection Agency*

EST: secuencias expresadas (*Expressed Sequence Tags*)

FAD: flavina adenina dinucleótido

GCL: glutamil cisteinil ligasa

GPx: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

GRE: elemento de respuesta a glucocorticoides (*Glucocorticoid Response Element*)

Grx: glutarredoxina

GS: glutatión sintetasa

GSH: glutatión

GSSG: disulfuro de glutatión (glutatión oxidado)

Gsp: glutationilespermidina

GspS: glutationilespermidina sintetasa

GST: glutatión S-transferasa

GSTc: glutatión S-transferasa citosólica

GST Fos A: proteínas bacterianas de resistencia a fosfomicina

h: horas

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*)

H-TrR: tioredoxina reductasa de alto peso molecular

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

IP: yoduro de propidio

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactósido

Kb: kilobase

LB: medio Luria Bertani

L-TrxR: tioredoxina reductasa de bajo peso molecular

MAPEG: GSTs microsomales (*Membrane Associated Proteins involved in Eicosanoid and Glutathione metabolism*)

mBrB: monobromobimano

m: media aritmética

MD: menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona)

min: minutos

MMA: monometil-arseniato

MRE: elemento de respuesta a metales (*Metal Response Element*)

MT: metalotioneína

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NEM: N-etilmaleimida

Abreviaturas

NTC: control sin ARN o ADNc (*No Template Control*)

N-term o N-terminal: amino terminal

ORF: marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*)

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PoL: peroxidación lipídica

PQ: paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo)

Px: peroxidasa

Pxr: peroxirredoxina

R²: coeficiente de correlación

RNS: especies reactivas de nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species*)

ROS: especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

RT-PCRq: PCR cuantitativa o a tiempo real

SECIS: secuencia específica para la inserción de la selenocisteína

SeCys: selenocisteína

SH: grupo tiólico

SOD: superóxido dismutasa

SSA: ácido sulfosalicílico

TAE: tampón Tris/Acetato/EDTA

TGR: tiorredoxina glutatión reductasa

Tm: temperatura de desnaturalización

TP: Transportadores de fosfato

TPrx: triparredoxina peroxidasa

Trx: tiorredoxina

TrxR: tiorredoxina reductasa

Try: tripanotion

TryR: tripanotión reductasa

TryS: tripanotión sintetasa

TryX: triparredoxina

T[SH]₂: tripanotión reducido

TS₂: tripanotión oxidado

X-gal: 5-bromo-4-indol-3-indolil-β-D-galactósido

XRE: elemento de respuesta a xenobióticos (*Xenobiotic Element Response*)

Summary

1. INTRODUCTION

Oxidative stress has been defined ([Finkel and Holbrook, 2000](#)) as a cell situation in which free radical or other oxidant agent production level is higher than cellular antioxidant defenses. The oxygen free radicals or reactive oxygen species (ROS) are partially reduced oxygen derivatives, very oxidant and reagents, such as; superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical (HO^{\cdot}), perhydroxyl radical (HO_2^{\cdot}), alkyl radical (RO^{\cdot}) and peroxy radical (ROO^{\cdot}). More recently ([Jones, 2006](#)), oxidative stress has been defined as a cellular stage in which an imbalance between oxidant and anti-oxidant molecules exist. At present, oxidative stress definition ([Jones, 2008](#)) is based on the “Redox” hypothesis, which is developed in four postulates:

- 1) All living systems present redox elements which are molecules with rich Cys residues, and they take part in cell signaling processes, macromolecular traffic and physiological regulation.
- 2) The organization and coordination of these elements take place by “redox circuits”, which have common nodes, like glutathione (GSH) or thioredoxin (Trx).
- 3) These “redox-sensitive” molecules are located in different cell compartments and they are activated by different signaling routes. And
- 4) The oxidative stress consists in a dysfunction of these “redox circuits”, which may be originated by the interaction of ROS with any thiol antioxidants, alteration of any electronic transfer or the interruption of mechanisms controlling the normal flow across these pathways.

These ROS can induce harmful effects in the cell, at three different levels: lipid peroxidation (peroxidized membranes are more rigid and loses its permeability and integrity), oxidative damage in proteins (oxidation of certain amino acids can produce protein conformational changes altering their functions) or DNA (oxidative damage in mitochondrial DNA is about 15

Summary

times higher than that in nuclear DNA). Damaged molecules (DNA and proteins) and organelles (mitochondria) by oxidative stress must be eliminated by autophagy to maintain the cell homeostasis. A drastic cellular redox homeostasis alteration can induce cell death by apoptosis, autophagy or necrosis (Scherz-Shouval and Elazar, 2007; Circu and Aw, 2008).

Among potential oxidative stress inducers a great variety of different chemicals exist, such as; quinones, nafto- and nitroquinolones, polycyclic aromatic hydrocarbons and certain pesticides (malathion and paraquat) among organic compounds, and metals or metaloids from inorganic ones.

Metal(oid)s can induce oxidative stress directly or indirectly. Metals with redox activity can produce free radicals by two main ways; auto-oxidation and Fenton/Haber-Weiss reactions (Halliwell and Gutteridge, 1999). Cadmium ions (Cd^{2+}) can form ROS (mainly superoxide anions and hydrogen peroxide), which can originate damages in lipids, enzymes and DNA (Watjen and Beyersmann, 2004; Valko *et al.*, 2005; Bertin and Averbeck, 2006). Arsenic cations (arsenate, As^{5+}) generates a variety of ROS including superoxide, singlet oxygen, peroxy radical, hydrogen peroxide or reactive nitrogen species (RNS), like nitric oxide. Copper (Cu^{2+}) is an essential metal for all living systems. This metal has redox activity, therefore its toxic capacity is due to ROS formation (mainly hydroxyl anions) and originating lipid peroxidation (at cytoplasm membrane and mitochondria levels) and DNA damages. Zinc (Zn^{2+}) is also an essential metal, it is presented in more than 300 metalloenzymes, with an important antioxidant function. However, at high concentrations this metal can be oxidant inducing apoptosis (Truong-Tran *et al.*, 2001; Formigari *et al.*, 2007). Lead (Pb^{2+}) is another toxic metal which can induce superoxide anions, it can also form complexes with these anions that are more reactive and oxidants (Ahamed and Siddiqui, 2007; Verstraeten *et al.*, 2008).

Paraquat is a herbicide interfering on cell antioxidant systems (glutathione and thioredoxin), which alter the intracellular redox equilibrium originating oxidative stress and inducing apoptosis or necrosis (Takizawa *et al.*, 2007). Menadione (vitamin K3) is a quinone that is used to induce oxidative stress. This oxidative process presents two main ways: decreasing the reduction capacity involved in oxidoreductase reactions and the superoxide radicals production (Thor *et al.*, 1982).

Cells use different antioxidant defenses against oxidative stress that can be classified in two categories: non-enzymatic and enzymatic antioxidants. The first category groups very diverse molecules, including glutathione and thioredoxin, vitamins, carotenoid pigments, metallothioneins, phytochelatin and other Cys rich proteins. The enzymatic antioxidants include

enzymes join working against superoxide radicals and hydrogen peroxide, such as; superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (Px), glutathione reductase (GR), thioredoxin reductase (TrxR), among others.

Three different, but not exclusive, antioxidant systems exist in prokaryotic or eukaryotic cells; GSH/GR (glutathione/glutathione reductase), Trx(SH)₂/TrxR (thioredoxin/thioredoxin reductase) and T[SH]₂/TryR (trypanothion/trypanothion reductase).

Glutathione (GSH) is a tripeptide (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine), present in all aerobic organisms (from bacteria to animals) (Fahey, 2001; Meister and Anderson, 1983). It is the most abundant non-protein thiol that defends against oxidative stress. In normal conditions, the cell concentration is into the range 0.5 - 10 mM, and about 98% of the total glutathione is in thiol-reduced form (GSH). The structure of GSH is unique because the peptide bond linking glutamate and cysteine is through the γ -carboxyl group of glutamate rather than the conventional α -carboxyl group. The only enzyme that can hydrolyze this bond is γ -glutamyl-transpeptidase (γ GT), which is only present on the external surfaces of certain cell types. As a consequence, GSH is resistant to intracellular degradation and is only metabolized extracellularly by cells expressing γ GT. The GSH synthesis involves two ATP-requiring enzymatic steps: formation of γ -glutamylcysteine from glutamate and cysteine and formation of GSH from γ -glutamylcysteine and glycine. The first step is catalyzed by GCL (glutamate-cysteine ligase or formerly γ -glutamylcysteine synthetase). The second step is catalyzed by GSH synthetase (GS). GCL is considered rate limiting, so the overexpression of GS failed to increase GSH level whereas overexpression of GCL increases GSH level.

GSH has several vital functions, including; antioxidant defense, detoxification of xenobiotics and other toxic agents, regulation of cell cycle and apoptosis, storage of cysteine (Cys), maintenance of redox potential, among others.

Glutathione reductase (GR) is involved in the reduction of disulfide-oxidized (GSSG) to functional antioxidant GSH (thiol-reduced). This enzyme appears in all organisms with glutathione, and it is included in the same family of thioredoxin reductase (TrxR). In animals two different GR isoforms exist (cytoplasmic and mitochondrial), and both are encoded by the same gene. GR synthesis is up-regulated by several stressors and its gene expression is induced by oxidative stress.

Glutathione transferases or glutathione-S-transferases (GSTs) are a superfamily of multifunctional proteins. Their main activity consists in the transference of GSH to non-polar molecules with carbon, nitrogen or sulphur atoms. A consequence of this reaction is the detoxification

Summary

of xenobiotic compounds and other environmental pollutants. Several GSTs might have peroxidase, isomerase or thioltransferase activity (Board *et al.*, 2000). GSTs are present in almost all organisms (eukaryotic or prokaryotic). This enzyme superfamily includes 4 families, according to their cell location; cytosolic, mitochondrial, microsomal (MAPEG: *Membrane Associated Proteins involved in Eicosanoid and Glutathione metabolism*) and FosA (fosfomicin resistant bacterial proteins) GSTs. At present, the cytosolic GSTs are classified in 15 different classes, according to their amino acid sequences, 3D structure, enzymatic activity and immunological features. Three classes (Zeta, Theta and Omega) are present in all phyla, four classes (Alpha, Sigma, Mu and Pi) are animal specific, and two classes (Delta and Epsilon) are insect specific (Tu and Akgul, 2005; Udomsinprasert *et al.*, 2005). Furthermore, there are three classes (Phi, Tau and Lambda) plant specific (Edwards and Dixon, 2005). Other GST classes have been only isolated from microorganisms; a Gamma class from fungi (Sato *et al.*, 2009), a Beta class from bacteria (Allocati *et al.*, 2009), and a Chi class from cyanobacteria (Wikteliu and Stenberg, 2007). GST genes from the same class appear in clusters on different chromosome regions. All cytosolic GSTs are homo or hetero-dimers (two subunits from the same class), and each subunit has two binding sites; G region (domain-I residues) that is the GSH binding site and H region (domain-II residues) or substrate binding site. This last domain presents a large variability degree, which give a wide substrate range for these enzymes.

Glutathione peroxidases (GPxs) are a superfamily of enzymes which catalyze the reduction of hydrogen peroxide (H_2O_2) or organic hydro-peroxides to H_2O or the corresponding alcohols, using GSH (or thioredoxin) as an electron-donor. Almost all mammalian GPxs are selenoproteins (with a SeCys residue instead Cys in the enzyme active site). However, GPxs from bacteria, yeasts, plants and parasite protists lack the SeCys residue. The main function of these enzymes is the cell protection against the oxidative stress.

Another antioxidant molecules are thioredoxins (Trx), which are small proteins (≈ 12 KDa) with redox activity, present in all living systems (from bacteria to human). All Trx molecules have a conserved amino acid sequence (Cys-Gly-Pro-Cys) in their active site. Both Cys residues can give electrons for reduction different substrates. In general, thioredoxins can have two different main functions; they can act like cofactors of several enzymes or antioxidant molecules. The expression of Trx genes are induced by oxidative stress.

Thioredoxin reductase (TrxR) is involved in the Trx reduction using NADPH as electron-donor. This enzyme is included into the flavoprotein oxidoreductase family, which are homodimeric. Two types of TrxRs can be distinguished; H-TrxRs (high molecular mass, ≈ 55 KDa) and L-TrxRs (low molecular mass, ≈ 35 KDa), and both are exclusive (at present, any sequenced

genome exist with both TrxR types). Between both types of TrxR sequences a low identity level (20 %) exists. H-TrxRs are selenoproteins, with SeCys in a very conserved sequence located in a second redox active site. L-TrxRs are present in bacteria, fungi, plants and certain microaerobic protists. L-TrxRs can only use thioredoxin as substrate unlike H-TrxRs which can use other substrates (Gasdaska *et al.*, 1999).

Trypanothione ($T[SH]_2$) is a low molecular mass thiol, constitutes by two glutathion molecules and one polyamine (spermidine). This antioxidant molecule is present in trypanosomatids, which substitute the GSH/GR system by $T[SH]_2$ / TryR system. The $T[SH]_2$ (reduced-form) acts similarly to GSH, supporting the cellular redox homeostasis. This antioxidant system is not exclusive of trypanosomatids, because it has been also detected in *Euglena gracilis* (with both systems GSH/GR and $T[SH]_2$ /TryR) (Montrichard *et al.*, 1999) and the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri* (without mitochondria and also with both systems) (Ondarza *et al.*, 2006). This molecule is synthesized in two steps (both with ATP spending). In different *Trypanosoma* and *Leishmania* species both synthetic steps are catalyzed by only one enzyme; trypanothione synthetase (TryS) (Oza *et al.*, 2002). However, *Crithidia fasciculata* has two different enzymes (one for each step); glutathionyl-spermidine synthetase (GspS) and trypanothione synthetase (TryS). Some bacteria (like *Escherichia coli*) can synthesize glutathionyl-spermidine (Gsp), but not $T[SH]_2$ (Tabor and Tabor, 1975). These enzymes have two domains; N-terminal (with amidase activity) and C-terminal (with synthetase activity), which means that these enzymes have antagonistic functions; synthetase activity forms $T[SH]_2$ and the amidase activity hydrolyzes $T[SH]_2$ releasing glutathione and spermidine. Trypanothione-oxidized is recycled to $T[SH]_2$ by the enzyme trypanothione reductase (TryR). Both enzymes (TryR and GR) present a high similarity.

In this PhD research work, we try to reach the following aims:

- 1) Know the GSH relevance in the cell stress response to heavy metals and other environmental stressors in the ciliate *Tetrahymena thermophila*.
- 2) Evaluate the cell necessity of antioxidant enzymes involved or not in GSH metabolism under metal stress and other environmental stressors.
- 3) Carry out an in silico comparative analysis of the selected antioxidant enzymes.
- 4) Propose a possible scenery, after integrating all results, of the cell response to stress by metal(oid)s.

2. MAJOR FINDINGS

1) *Tetrahymena thermophila* response to stress by Cd^{2+} using two main molecules with thiol groups; metallothioneins (Díaz *et al.*, 2007) and glutathione (GSH) as a part of the antioxidant system GSH/GR, which constitutes the reduction source against the oxidative stress induced by Cd^{2+} . In this process are involved enzymes such as; GPxs (at least 5 GPx genes are over-expressed) and TrxRs (at least 2 isogenes are over-expressed). Cd^{2+} also induced apoptosis in *T. thermophila* (Gutiérrez *et al.*, 2008), which might involve modulating molecules like GSTs (at least 4 isogenes are over-expressed).

2) In this ciliate, the use of GSH is the first cellular defense line against As^{5+} stress, which acts as a reduction source for enzymes involved in offset the oxidative stress originated by this metalloid. Enzymes, such as; GPxs and TrxRs (2 isogenes of each enzyme type are over-expressed). Likewise, the reduction of As^{5+} to As^{3+} (reported by Yin *et al.*, 2011 in this ciliate) needs GSH for the corresponding enzyme (arsenate reductase). Also, GSTs (at least 4 types of GST genes are over-expressed) spend GSH which can be transferred to derivatives from the lipid peroxidation induced by As^{5+} . In a second cellular defense line, after an extensive exposure to arsenate, metallothioneins might have a detoxification role by binding this metalloid.

3) Pb^{2+} , like Cd^{2+} or As^{5+} , also induces the expression of the antioxidant system GSH/GR genes; *TtGCL* and *TtGR* genes are significantly over-expressed under both short and extensive metal exposures. Also, *TtGSTO1/6* and *TtGSTT1/3* genes are induced like it occurs under Cd^{2+} or As^{5+} .

4) In general, the essential metals Cu^{2+} and Zn^{2+} induce a lower number of the selected genes, and present lower induction values. *TtGspS2* and *TtGspS4* genes (which are not expressed under before metal(oid)s) are those that more express under these essential metals. Which is correlated with the highest intracellular trypanothione levels after treatment with these metals. Seen to be that the exposure to these essential metals (with a lower toxicity regard non-essential metals) does not require a cell defense as important as that against Cd^{2+} or As^{5+} .

5) CDNB (substrate of GST enzymes and inducer of GST genes) is the molecule inducing the highest number of GST genes. All analyzed GST genes are over-expressed under CDNB, excepting the isoform *TtGSTM40*, like under the rest of analyzed stress conditions.

Likewise, antioxidant system GSH/GR genes are over-expressed under the CDNB treatment, providing GSH for GSTs. The other two antioxidant systems present in *T. thermophila* ($\text{TrxSH}_2/\text{TrxR}$ and $\text{T[SH]}_2/\text{TryR}$) also respond to CDNB, mainly the over-expression of the *TtTrxR2*

gene (among others) and the *TtGspS4* gene (more than ≈ 200 times the basal gene expression). The cytoplasmic $T[SH]_2$ concentration under CDNB treatment is similar to that in controls, therefore seen to be that CDNB demands a higher $T[SH]_2$ concentration, over-expressing the *TtGspS4* gene and the cell spend more $T[SH]_2$ that is used in the cellular defense against the oxidative stress originated by the CDNB.

6) MD seen not to be an oxidative stress inducer as strong as CDNB (after the same treatment period). From all analyzed genes, only *TtGCL* gene is highly over-expressed (more than 100 x), indicating the GSH necessity. Likewise, it is related with the total cellular GSH decreasing and the cell mortality increasing induced by MD. PQ (after an extensive exposure) induces significantly the over-expression of five *GST* genes, *TtGCL* and *TtGspS4* genes and only two *TtTrxR* genes. The ranking values of inducing capacity for the *TtGCL* gene is MD>>CDNB >PQ. *TtGSTO1* is another induced gene by these stressors, with a different ranking induction values; CDNB>>PQ >MD.

7) Acid pH(pH 5) induces almost exclusively the over-expression of the *TtGCL* gene (more than 100 x). The role of GSH under acid pH is very little known, however in bacteria GSH protect the cell against acid stress (Ricciolo *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007). It is the first time that the over-expression of a GCL gene induced by acid stress is reported in an eukaryotic microorganism. On the other hand, the total intracellular GSH level (after inhibiting the GCL enzyme by BSO) is similar to that from cells under acid pH without BSO. An interpretation of this result might be that the inhibition levels by BSO are lower that the production levels of new GCL enzyme, so maintaining the GCL enzyme levels to acid pH similar to that under neutral pH. At basic pH (pH 9) not relevant gene induction is detected.

8) An extensive starvation (24 h) only induces the over-expression (about 23 x) of the *TtTrxR5* gene (without TrxR domain). This gene corresponds to the EST (DY678605.1) isolated from expression gene libraries obtained from *T. thermophila* starved during 1- 6 h (A.Turkewitz, unpublished data). This gene might have an important function during starvation, which is unknown yet.

9) *TtGCL* gene.

9a) Like other eukaryotic microorganisms (*Trypanosoma brucei* or *Schizosaccharomyces pombe*), the *T. thermophila* macronuclear genome contains only one copy of the gene *TtGCL*(encoding the GCL enzyme).

9b) The inferred *TtGCL* protein sequence is unique among eukaryotic microorganisms, including other ciliates (*Paramecium tetraurelia* and *Ichthyophthirius multifiliis*), because, at pre-

Summary

sent, it is the smallest GCL known (405 aa). Though, the TtGCL is more similar to GCLs from chloroplasts, certain pathogen bacteria and cyanobacteria. However, the identity of this protein classifies it into the eukaryotic group (excluding plants), together mammals, insects, nematodes and parasite protozoa. From a phylogenetic point of view the TtGCL is included into protist group, which seen to have as common ancestor the GCL from *Trypanosoma* (kinetoplastid), that, in turn, might be related with cyanobacteria GCLs. Three ciliate analyzed GCLs are connected with the PbGCL (from *Plasmodium berghei*) (apicomplexa), which is in agreement with the phylogeny based on α γ β -tubulins.

9c) A possible evolutionary history of GCLs, after application the serial endosymbiosis might have been the following; Cyanobacteria --> chloroplasts (secondary endosymbiosis in a first aerobe eukaryotic cell) --> Rhodophyta --> (tertiary endosymbiosis in a heterotroph flagellated - Euglenida) --> Heterotroph Dinoflagellata (Cryptomonad) --> (another tertiary endosymbiosis in a heterotroph flagellated) --> Ciliate (Ciliophora). In the list of plastid genes which might have been transferred from the plastid genome to the host nucleus (heterotroph eukaryotic cell), there is two related with GSH metabolism ; GSH reductase and GSH peroxidase. To this list, we can also incorporate to GCL (phylogenetically previous to the before cited GSH enzymes), and GCL from *T. thermophila* and other ciliates corroborate this possible phylogeny model.

9d) The transcriptional induction of the *TtGCL* gene is higher to short exposures (2h) of the metal(oid) with regard longer exposures (24h). It is in agreement with the idea that cell response fast against oxidative stress induced by the metal(oid) (first cellular line of defense). Indicating that in *T. thermophila* (like other organisms) GSH is an essential molecule against oxidative stress.

10) The *T. thermophila* GST family.

10a) The *T. thermophila* macronuclear genome has 63 gene isoforms encoding putative GSTs. So, at present, this ciliate is the living thing with the highest number of GST genes. After an *in silico* structural analysis of inferred amino acid sequences, 47 GSTs ($\approx 74\%$) are classified into Mu class (until now a GST class exclusive of mammalian). Besides, both *T. thermophila* and *P. tetraurelia* present two GST isoforms non-classifiable in any known GST group, so they can be consider as specie-specific GSTs.

10b) Unlike human, the majority of *T. thermophila* GST genes do not have introns. This absence prevents the "alternative-splicing" process that involves variability among GSTs. It might be an explanation for the raised number of GST isogenes presents in this ciliate, which are

necessary to respond to different substrates. On the other hand, all *P. tetraurelia* GST genes have introns. Like other organisms, GST genes appear clustered in the same or different chromosomes. Near genes into the same cluster have a higher sequence homology, which might indicate that these isogenes have been originated by gene tandem duplication and posterior divergence (paralogs).

10c) Unlike GSTs from other protozoa (*Blepharisma japonicum*, *Plasmodium falciparum*), those from *T. thermophila* are the only onemore similar to mammalian GSTs (at both levels; sequence homology and 3D structure).

10d) The presence of Mu class GSTs in ciliated protozoa, such as; *T. thermophila* and *P. tetraurelia*, changes some aspects of the standard model on the evolutionary history of cytosolic GSTs:

- a) Mu class GSTs cannot be already consider exclusive from mammals. Ciliates date back from Proterozoic (Paleo-/Mesoproterozoic, $\approx 10^9$ years ago), so they are older than fungi, and, of course, than vertebrates, therefore the Mu class seen to be more ancient that previously considered.
- b) Likewise, the presence of Tyr (Y) into the catalytic domain (G-site) seen not to be an innovation of the mammalian Mu class GSTs, because it already existed in ciliate GSTs, coexisting with Ser (Theta and Zeta GSTs) and Cys (Omega GSTs).

10e) Three *T. thermophila* Mu class GSTs (TtGSTM1, M8 and M45) present unique features among known GSTs:

- TtGSTM1 is the first described GST with a "Ring-finger" domain, and a possible enzymatic activity similar to E3 enzymes (ubiquitin-ligase), besides the corresponding GSH transferase activity.
- TtGSTM8 is the first described GST with a GCC domain, and it might be involved in the organization and/or function of Golgi system.
- The three Mu GSTs (M1, M8 and M45) present trans-membrane domains and homology with typical Mu class cytosolic GSTs (or soluble not associated to membranes). Therefore, it constitutes an interesting exception find three cytosolic GSTs which, however, are membrane associated.

10f) A comparative analysis of the different *TtGST* gene expression patterns, reveals that certain differential gene expression level exists among some of them. For instance; *TtGSTM3* and *TtGSTZ2* genes are over-expressed almost exclusively at acid or basic pH unlike the rest of analyzed GST genes. With regard to GST gene induction by metal(oid)s, a gene expression

Summary

ranking exist among *TtGST* genes; the *TtGSTZ2* gene is in the first place in the ranking, together *TtGSTO1* and *TtGSTO6* genes. So, these GST genes might encode the main GST involved in the stress response against non-essential metal(oid)s. Cd^{2+} and As^{5+} induce the highest number of *TtGST* genes, and, on the other hand, Zn^{2+} and Cu^{2+} (essential metals) induce the lowest number of *TtGST* genes.

10g) The specie-specifics *TtGST* genes (*TtGSTN1* and *N2*) together *TtGSTM9* and *TtGSTZ1*, are those showing a higher selectivity or specificity to stress (only are over-expressed by 3 or 4 stressors). On the other hand, *TtGSTM3*, *TtGSTO1* and *TtGSTZ2* genes show a more wide stress response or against a higher number of different stressors. All studied *TtGST* genes (excepting *TtGSTM40*) respond to the GST inducer (or substrate) CDNB, independently that it can be used or not as a substrate for these enzymes. So, it seen to be that the “GST substrate” and “GST gene expression inducer” CDNB features might be independent.

10h) Both ciliate-models, *T. thermophila* and *P. tetraurelia*, are paradigmatic examples of gene redundancy. This phenomenon is a gene mechanism for cell environmental adaptation, which produces ecoparalogs with intermediate or low divergency (high identity %). The *T. thermophila* GST family seen to beconstitutes, at least partly, by ecoparalogs.

11) The *T. thermophila* TrxR family and GR.

11a) The ciliate *T. thermophila*, together parasite protozoa from the apicomplexa group, presents H type TrxRs. At present, they are the only one from *Alveolata* phylum in which both TrxR and GR enzymes coexist.

11b) Three (from the five) TtTrxRs (TtTrxR1, R3 and R4) are selenoproteins, which may be included into the III type (like those from mammals), while the rest (TtTrxR2 and R5) might be included into II type (like those from insects). The phylogenetic analysis reveals a possible common origin of TtGR with TrxRs, which might have a common origin with an ancestral protein similar to GR. It might involve that, at least in some protists (like *Tetrahymena*), the GR could arise from a TrxR that lost the typical catalytic C-terminal domain (common in these enzymes).

11c) The low number of selenoproteins presents in the ciliate *T. thermophila* (a microorganism habitually living in aquatic ecosystems), do not corroborate the hypothesis from Lobanov et al. (2007), according to which aquatic organisms have a major number of selenoproteins.

11d) The quantitative gene expression analysis (qRT-PCR) of these genes revealed that a different temporal response among the five *TtTrxR* gene isoforms exists. Three of them over-express to short exposures, while two over-express to longer exposures, independently of the

stressor. On the other hand, the TtGR gene expression is higher or lower depending on the stressor type but not on exposure time. *TtTrxR2*, *TtTrxR5* and *TtGR* genes over-express at highest levels under As^{5+} or Cd^{2+} exposure (both generate oxidative stress). These three genes are not selenoproteins, it might suggest that Cys residues (with -SH groups instead -SeH groups) might have a major affinity to metal(oid)s, and so inhibiting the catalytic domain of these enzymes. Then, it might induce an over-expression of these genes, so increasing the cell concentration of viable enzymes.

12) The *T. thermophila* T[SH]₂ / TryR system and genes similar to TryS or GspS.

12a) The *T. thermophila* macronuclear genome has 4 genes similar to GspS from other organisms (mainly with bacterial GspS). Any of them have the amidase domain, so their similarity with other GspS or TryS resides exclusively in the synthetase domain. The only presence of synthetase domain in these TtGspS constitutes an unique feature among the rest of organisms with TryS or GspS (with both domains).

12b) *GspS2* gene express under non-stress conditions, excepting under a prolonged Zn^{2+} exposure.

12c) CDNB treatment demand more amount of T[SH]₂, *TtGspS4* gene is over-expressed and the T[SH]₂ requirement is higher, while Cu^{2+} treatment demand less T[SH]₂, the *TtGspS4* genes down-expressed, spending less and accumulating more T[SH]₂.

12d) The existence of T[SH]₂ in *T. thermophila* has been showed by HPLC and mass spectrometry. However, *T. thermophila* putative genes which might be involved in T[SH]₂ synthesis are more similar to GspS. Like in several trypanosomatid protozoa that only exist one enzyme (named as TryS) which catalyze both steps of the T[SH]₂ synthesis, we propose that in this ciliate might exist an enzyme (more similar to GspS) with capacity to catalyze both steps.

12e) In *T. thermophila* an similar activity to TryR (T[S]₂ → T[SH]₂) has been detected, and it corroborates the existence of T[SH]₂ in this ciliate. Though this enzymatic activity is about three times lower than GR activity, both activities increase under metals (Cu^{2+} and Zn^{2+}) treatments. However, we have not found any TryR homologous gene in the macronuclear genome of this ciliate. Due to the structural similarity with TryRs, some of the three TtTrxR (R1, R2 or R4) might have this function. Mainly TtTrxR2, because the corresponding gene (TtTrxR2) is over-expressed under Cu^{2+} or CDNB treatment, which agrees with the higher TryR enzyme activity obtained under these same treatments.

Summary

12f) Due to the presence of the T[SH]₂ / TryR system in the ciliate *T. thermophila*, the model on the evolutionary history of the TryS / GspS, proposed by several authors (Manta *et al.* 2013; Oza *et al.* 2005), should be modified. The new model that we propose involves that a gene duplication and diversification of the GspS gene, present in a kinetoplastid and alveolata common ancestor, originated the TryS gene and the T[SH]₂ production. Later, in some trypanosomatid and ciliates, the loss of the GspS gene copy (like in *T. brucei*) or TryS gene copy (like in *T. thermophila*) might have been originated. And so, both steps of the T[SH]₂ synthesis might be carried out for only one enzyme (TryS or GspS).

3. CONCLUSIONS

From results obtained in this PhD research-work, we infer the following general conclusions:

1) At present, *Tetrahymena thermophila* is the only free living protist in which three different antioxidant systems (GSH/GR, TrxSH₂/TrxR and Try[SH]₂/TryR) coexist. According to global results and used stress conditions, the ranking of activity levels of these three systems is; GSH/GR > TrxSH₂/TrxR > Try[SH]₂/TryR. Therefore, in this ciliate the Try[SH]₂/TryR system might have a secondary function in maintaining the cell redox equilibrium, though the three systems might also act coordinately on the cellular antioxidant defense.

2) Results from experiments with BSO (a GSH biosynthesis inhibitor) or NEM (a thiol group blocker), have shown the relevance of GSH and other molecules with (-SH) groups in the cellular defense against metal(oid)s or oxidant agents.

3) *T. thermophila* GCL is unique among studied eukaryotic microorganisms, because, at present, it is the smallest GCL known (405 aa). Due to its phylogenetic location, the GCL of this ciliate might corroborate its possible plastid origin, together others GSH metabolism enzymes (like GSH reductase and GSH peroxidase).

4) At present, *T. thermophila* is the living thing with the highest number (63) of GST gene isoforms. About 74% of them have been classified into the Mu class, which has been considered a GST class exclusive of mammals. Therefore, the presence of Mu class GSTs in ciliates, such as; *T. thermophila* or *Paramecium tetraurelia*, alters certain aspects of the standard-model on the evolutionary history of the cytosolic GSTs.

5) A comparative gene expression analysis by qRT-PCR of GST gene isoforms, has revealed certain differential gene expression level among some of them, under different stress conditions. Therefore, the *TtGST* gene family seems to constitute, at least a part of them, by ecoparalogs.

6) Experiments with CDNB (substrate and inducer of GST genes) have shown the possibility that the “GST substrate” character and “GST gene inducer” might be independent features.

7) At present, *T. thermophila* and parasite protozoa from *Aplicomplexa* phylum, are the only one from the *Alveolata* super-phylum in which both enzymes TrxR and GR coexist. Likewise, it is the only non-photosynthetic protist nor parasite presenting H-type (high molecular mass) TrxRs, which are characteristic of animals.

8) The phylogenetic analysis reveals a possible common origin of TtGR with TrxRs, which might have a common origin with an ancestral protein similar to GR. It might involve that, at least in some protists (like *Tetrahymena*), the GR could arise from a TrxR that lost the typical catalytic C-terminal domain (common in these enzymes).

9) The only presence of synthetase domain in four *T. thermophila* GspSs constitutes an exclusive feature of this microorganism, because the rest of studied organisms with GspS or TryS always present both domains (amidase + synthetase).

10) We propose that, like it occurs in some trypanosomatids with only one enzyme (identified as TryS) which catalyze both steps of the Try[SH]₂ synthesis, in *T. thermophila* might exist also only one enzyme (more similar to GspS) with capacity to catalyze both phases of the Try[SH]₂ synthesis.

11) Due to the presence of the T[SH]₂ / TryR system in the ciliate *T. thermophila*, the evolutionary history model for TryS / GspS, proposed by several authors, should be modified. The new model that we propose involves that a gene duplication and diversification of the GspS gene, present in a kinetoplastid and alveolata common ancestor, originated the TryS gene and the T[SH]₂ production. Later, in some trypanosomatid and ciliates, the loss of the GspS gene copy (like in *T. brucei*) or TryS gene copy (like in *T. thermophila*) might have been originated. And so, both steps of the T[SH]₂ synthesis might be carried out for only one enzyme (TryS or GspS).

4. REFERENCES

- Ahamed, M. and Siddiqui, M. K. (2007). Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clinica Chimica Acta* **383**(1-2): 57-64.
- Allocati, N.; Federici, L.; Masulli, M. and Di Ilio, C. (2009). Glutathione transferases in bacteria. *The FEBS Journal* **276**(1): 58-75.
- Bertin, G. and Averbeck, D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88**(11): 1549-1559.

Summary

- Board, P. G.; Coggan, M.; Chelvanayagam, G.; Easteal, S.; Jermini, L. S.; Schulte, G. K.; Danley, D. E.; Hoth, L. R.; Griffor, M. C.; Kamath, A. V.; Rosner, M. H.; Chrnyk, B. A.; Perregaux, D. E.; Gabel, C. A.; Geoghegan, K. F. and Pandit, J. (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. The Journal of Biological Chemistry **275**(32): 24798-24806.
- Circu, M. L. and Aw, T. Y. (2008). Glutathione and apoptosis. Free Radical Research **42**(8): 689-706.
- Díaz, S.; Amaro, F.; Rico, D.; Campos, V.; Benítez, L.; Martín-González, A.; Hamilton, E. P.; Orias, E. and Gutiérrez, J. C. (2007). Tetrahymena metallothioneins fall into two discrete subfamilies. PLoS One **2**(3): e291.
- Edwards, R. and Dixon, D. P. (2005). Plant glutathione transferases. Methods in enzymology **401**: 169-186.
- Fahey, R. C. (2001). Novel thiols of prokaryotes. Annual Review of Microbiology **55**: 333-356.
- Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature **408**(6809): 239-247.
- Formigari, A.; Irato, P. and Santon, A. (2007). Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. Comparative Biochemistry and Physiology **146**(4): 443-459.
- Gasdaska, P. Y.; Berggren, M. M.; Berry, M. J. and Powis, G. (1999). Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase. FEBS letters **442**(1): 105-111.
- Halliwell, B. G. and Gutteridge, J. M. C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford. University Press
- Jones, D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. American Journal of Physiology. Cell Physiology **295**(4): C849-868.
- Jones, D. P. (2006). Redefining oxidative stress. Antioxidants & Redox Signaling **8**(9-10): 1865-1879.
- Manta, B.; Comini, M.; Madeiros, A.; Hugo, M.; Trujillo, M. and Radi, R. (2013). Trypanothione: A unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. Biochimica et Biophysica Acta **1830**: 3199-3216.
- Meister, A. and Anderson, M. E. (1983). Glutathione. Annual Review of Biochemistry **52**: 711-760.
- Montrichard, F.; Le Guen, F.; Laval-Martin, D. L. and Davioud-Charvet, E. (1999). Evidence for the co-existence of glutathione reductase and trypanothione reductase in the non-trypanosomatid Euglenozoa: *Euglena gracilis* Z. FEBS letters **442**(1): 29-33.

- Ondarza, R. N.; Hurtado, G.; Tamayo, E.; Iturbe, A. and Hernandez, E. (2006). *Naegleria fowleri*: a free-living highly pathogenic amoeba contains trypanothione/trypanothione reductase and glutathione/glutathione reductase systems. Experimental Parasitology **114**(3): 141-146.
- Oza S. L.; Shaw M.P.; Wyllie, S. and Fairlamb, A. H. (2005). Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. Molecular and Biochemical Parasitology **139**(1):107-116.
- Oza, S. L.; Tetaud, E.; Ariyanayagam, M. R.; Warnon, S. S. and Fairlamb, A. H. (2002). A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. The Journal of Biological Chemistry **277**(39): 35853-35861.
- Riccillo, P. M.; Muglia, C. I.; De Bruijn, F. J.; Roe, A. J.; Booth, I. R. and Aguilar, M. (2000). Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici* including acid tolerance. Journal of Bacteriology **182**: 1748-1753.
- Sato, I.; Shimizu, M.; Hoshino, T. and Takaya, N. (2009). The Glutathione System of *Aspergillus nidulans* Involves a Fungus-specific Glutathione S-Transferase. The Journal of Biological Chemistry **284**(12): 8042-8053.
- Scherz-Shouval, R. and Elazar, Z. (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. Trends in Cell Biology **17**(9): 422-427.
- Tabor, H. and Tabor, C. W. (1975). Isolation, characterization, and turnover of glutathionylspermidine from *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry **250**(7): 2648-2654.
- Takizawa, M.; Komori, K.; Tampo, Y. and Yonaha, M. (2007). Paraquat-induced oxidative stress and dysfunction of cellular redox systems including antioxidative defense enzymes glutathione peroxidase and thioredoxin reductase. Toxicology in Vitro **21**(3): 355-363.
- Thor, H.; Smith, M. T.; Hartzell, P.; Bellomo, G.; Jewell, S. A. and Orrenius, S. (1982). The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells. The Journal of Biological Chemistry **257**(20): 12419-12425.
- Truong-Tran, A. Q.; Carter, J.; Ruffin, R. E. and Zalewski, P. D. (2001). The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. Biometals **14**(3-4): 315-330.
- Tu, C. P. and Akgul, B. (2005). *Drosophila* glutathione S-transferases. Methods in Enzymology **401**: 204-226.
- Udomsinprasert, R.; Pongjaroenkit, S.; Wongsantichon, J.; Oakley, A. J.; Prapanthadara, L. A.; Wilce, M. C. and Kettermann, A. J. (2005). Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme. The Biochemical Journal **388**(Pt 3): 763-771.

Summary

- Valko, M.; Morris, H. and Cronin, M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. Current Medicinal Chemistry **12**(10): 1161-1208.
- Verstraeten, S. V.; Aimo, L. and Oteiza, P. I. (2008). Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. Archives of Toxicology **82**(11): 789-802.
- Watjen, W. and Beyersmann, D. (2004). Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. Biometals **17**(1): 65-78.
- Wikteliu, E. and Stenberg, G. (2007). Novel class of glutathione transferases from cyanobacteria exhibit high catalytic activities towards naturally occurring isothiocyanates. The Biochemical Journal **406**(1): 115-123.
- Yin, X. X.; Zhang, Y. Y.; Yang, J. and Zhu, Y. G. (2011). Rapid biotransformation of arsenic by a model protozoan *Tetrahymena pyriformis* GL-C. [corrected] Environmental Pollution **159**(4): 837-40.
- Zhang, J.; Fu, R-Y.; Hugenholtz, J.; Li, Y. and Chen, J. (2007). Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress. Applied and Environmental Microbiology **73**: 5268-5275.

Introducción

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Resumen de resultados

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

Introducción

1. ESTRÉS OXIDATIVO. CONCEPTO Y CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS.

Hasta hace poco tiempo, se definía estrés oxidativo como la situación que experimenta cualquier sistema biológico, cuando la producción de radicales libres u otros agentes oxidantes es superior a la capacidad de sus defensas antioxidantes (Finkel and Holbrook, 2000). Los radicales libres, son moléculas con capacidad de difusión y de pequeño tamaño, que poseen un electrón desapareado en su orbital más externo. Los radicales libres de oxígeno, más conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS), son derivados parcialmente reducidos del oxígeno, muy oxidantes y reactivos. Entre ellos se incluyen el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), el radical perhidroxilo (HO_2^{\cdot}), el radical alquil (RO^{\cdot}) y el radical peroxil (ROO^{\cdot}).

De los notables avances en este tema, que han aparecido en los últimos años, ha surgido una nueva definición más completa de estrés oxidativo. Por lo tanto, actualmente se considera que estrés oxidativo es el estado celular en el cual existe un desequilibrio entre moléculas oxidantes y moléculas antioxidantes, que produce daño macromolecular y la distorsión de los circuitos redox tiólicos, lo que conlleva la disfunción de los mecanismos de control y señalización celular mediados por estos sistemas redox (Jones, 2006) (Figura 1). Además, en esta nueva definición se consideran todas las moléculas oxidantes y no sólo los radicales libres, debido a que cuantitativamente son más importantes los oxidantes no radicales, como el peróxido de hidrógeno. La definición actual de estrés oxidativo se fundamenta en la hipótesis "Redox" (Jones, 2008), formulada en cuatro postulados o conclusiones, que se originan de los datos experimentales más recientes. Estos postulados son los siguientes:

- 1) Todos los sistemas biológicos poseen elementos redox, ricos en residuos de cisteína, que participan en procesos de señalización celular, tráfico de macromoléculas y regulación fisiológica.
- 2) La organización y coordinación de estos elementos tiene lugar mediante circuitos

Introducción

redox, que dependen de elementos comunes, como por ejemplo, el glutatión o la tio-redoxina.

3) Estos elementos redox-sensibles están distribuidos en compartimentos celulares diferentes y se activan mediante diferentes rutas de señalización.

4) El estrés oxidativo consiste en la disfunción de estos circuitos redox, causada por una reacción específica con cualquiera de estos elementos tiólicos, la alteración de cualquier ruta de transferencia electrónica o bien, la interrupción de los mecanismos que controlan el flujo a través de estas vías.

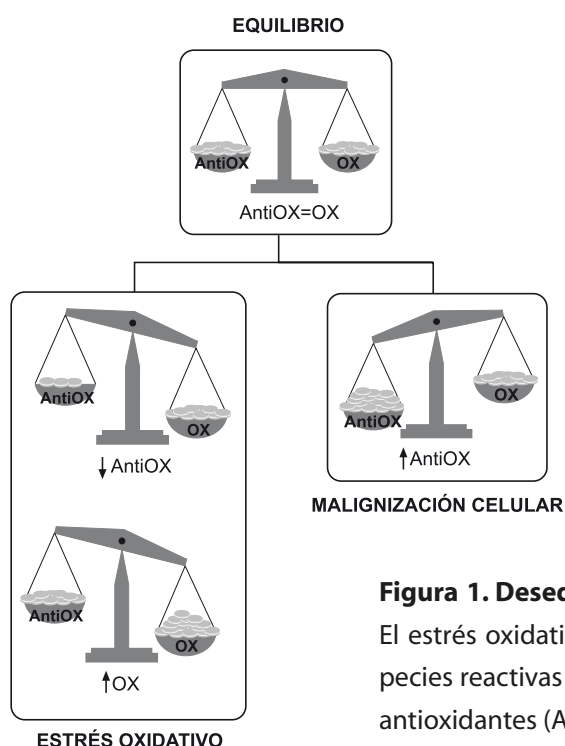


Figura 1. Desequilibrio entre moléculas oxidantes y antioxidantes.

El estrés oxidativo puede ser provocado por un incremento de las especies reactivas de oxígeno (Ox) o por una disminución de las defensas antioxidantes (AntiOx). El incremento descontrolado de los sistemas antioxidantes, puede dar lugar a procesos de malignización celular.

Por lo tanto, se puede producir estrés oxidativo tanto por procesos naturales endógenos (como por ejemplo, alteraciones de las cadenas respiratorias o fotodependientes de transporte electrónico), como por la exposición a toda una gama de elementos físicos o químicos y compuestos de naturaleza química muy variada, entre los que cabe destacar ciertos metales y metaloides, pesticidas organoclorados y organofosfatados, bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarburos poliaromáticos (PAHs), dioxinas, radiaciones, quinonas y epóxidos (Valavanidis *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2009).

En la respiración, los organismos vivos producen energía (ATP), mediante una serie de reacciones redox, en las que los electrones van "saltando" de unas moléculas a otras, y la energía que se libera en estos saltos se acopla a la producción de ATP. Cuando se trata de respiración

aerobia, el aceptor final de estos electrones es el oxígeno. Al ganar electrones, el oxígeno se reduce por un mecanismo que recibe el nombre de “vía univalente de reducción del oxígeno” (Figura 2). Este modelo implica que el oxígeno gana electrones uno a uno de forma que en el proceso se generan tres formas no reducidas totalmente del oxígeno, el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, que no es un radical, pero que puede generarlos y el radical hidroxilo. El radical hidroxilo es considerado el más reactivo y el principal iniciador del ataque a todo tipo de macromoléculas. Su alta reactividad le impide su difusión a largas distancias a través de la célula. El anión superóxido no es tan reactivo como el radical hidroxilo, pero es capaz de inactivar diversas enzimas. Además, en combinación con el peróxido de hidrógeno, es capaz de generar radical hidroxilo. Al conjunto de radicales libres y otras moléculas parcialmente reducidas del oxígeno se les denomina especies reactivas de oxígeno (ROS), y en exceso pueden ser capaces de producir estrés oxidativo (Turrens, 2003). Sin embargo, en organismos superiores, algunos radicales libres (peróxido de hidrógeno, superóxido, peróxido, óxido nítrico, etc) pueden inducir efectos biológicos beneficiosos, principalmente en procesos de regulación celular (Dröge, 2003). Diferentes enzimas oxidantes pueden ser otras fuentes endógenas de producción de

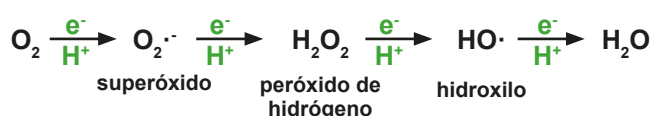


Figura 2. Vía univalente de reducción de oxígeno. En esta vía, el oxígeno gana electrones uno a uno y de esta manera se generan radicales libres y peróxido de hidrógeno.

ROS en las células. La xantina oxidasa, NADPH oxidasa o triptófano dioxigenasa que pueden originar anión superóxido, mientras que otras enzimas como la guanilato ciclasa y glucosa oxidasa generan peróxido de hidrógeno (Vigo-Pelfrey, 1990; Vignais, 2002).

En presencia de metales como el hierro o el cobre tiene lugar la combinación de la reacción de Haber-Weiss y la reacción de Fenton de forma que se incrementa la cantidad de radical hidroxilo (Leonard *et al.*, 2004).

El desequilibrio entre moléculas prooxidantes y sistemas antioxidantes tiene efectos nocivos para la célula. Este daño se produce principalmente a tres niveles:

Peroxidación lipídica: En organismos aerobios, los fosfolípidos de membrana están sometidos continuamente a oxidantes, procedentes de fuentes endógenas y exógenas. Los productos resultantes de la peroxidación de membranas y la peroxidación lipídica son un riesgo constante para las células. La peroxidación lipídica comprende una serie de reacciones oxidativas en cadena, que afectan a los ácidos grasos, especialmente insaturados, que son más sensibles a las reacciones producidas por ROS, debido a la presencia de dobles enlaces. Comienza

Introducción

con una reacción de iniciación, que consiste en la extracción de un electrón de un átomo de carbono contiguo a un doble enlace, componente del lípido poliinsaturado. De esta manera, se forma un radical lipídico alquil, que en presencia de O_2 dará lugar a un radical lipídico peroxil. Los peróxidos orgánicos así formados atacan a otros ácidos grasos propagando la reacción de peroxidación. La terminación de esta cadena de reacciones de peroxidación lipídica es el resultado de interacciones entre radicales lipídicos para dar lugar a compuestos no radicales del tipo 4-HNE (4-hidroxi-2-nonenal) o a la interacción de los radicales lipídicos con antioxidantes como la vitamina E. Los hidroperóxidos lipídicos pueden descomponerse fácilmente en varias especies reactivas, incluyendo radicales lipídicos alcoxil, aldehídos, alcanos, epóxidos lipídicos y alcoholes. Los principales productos de la peroxidación lipídica son el malondialdehído y el 4-HNE. Estos productos derivados de la peroxidación lipídica pueden formar bases alteradas (*DNA adducts*), dando lugar a mutaciones en bacterias y células de mamífero y patrones alterados de expresión génica. Asimismo, estos productos son carcinogénicos y pueden alterar proteínas (Valko *et al.*, 2007; Catala, 2009). Las membranas peroxidizadas son más rígidas y pierden su permeabilidad e integridad. Estos daños alteran irreversiblemente la funcionalidad de estas membranas y causan la inactivación de las enzimas localizadas en ellas (Catala, 2009).

Daño oxidativo a proteínas: Otra diana importante de las especies reactivas de oxígeno son las proteínas. Los mecanismos básicos involucrados en la oxidación de proteínas se han obtenido a partir de experimentos de exposición de proteínas, péptidos y aminoácidos a radiaciones ionizantes, tratamiento que sólo produce radicales hidroxilo y superóxido. Los resultados de estos estudios indican que la oxidación mediada por ROS puede ocasionar fragmentación de la cadena polipeptídica, oxidación de las cadenas laterales de los aminoácidos y a la formación de uniones proteína-proteína (Stadtman, 1998; 2006). Las oxidaciones de los aminoácidos dan lugar a derivados carbonilados, derivados hidroxilados y otros aminoácidos. Los aminoácidos más sensibles a la oxidación son histidina, metionina, prolina, arginina, lisina y cisteína. La oxidación de estos aminoácidos puede producir cambios conformacionales en las proteínas, de tal forma que se altere la funcionalidad de las mismas. Asimismo, puede generar uniones cruzadas proteína-proteína (Stadtman, 2006). En células eucariotas, las proteínas oxidadas tienden a formar agregados tóxicos con lípidos modificados y lisosomas, denominados genéricamente lipofuscina.

Daño oxidativo en el ADN: El ADN nuclear y mitocondrial es otro de los componentes celulares clave, que es especialmente susceptible al estrés oxidativo, inducido por especies reactivas de oxígeno. Además de las ROS, las especies reactivas de nitrógeno, como los peroxinitritos y óxidos de nitrógeno, también son capaces de ocasionar modificaciones en el ADN (Valko *et*

al., 2006). Se producen oxidaciones de pirimidinas y principalmente de purinas, deleciones, producción de sitios sin base (apurínicos), rupturas de hebra, puentes cruzados entre proteínas y ADN y reorganizaciones cromosómicas (Halliwell and Gutteridge, 1999; Valko *et al.*, 2004). Por su proximidad a la fuente de radicales libres, la mitocondria es el orgánulo principal de la célula donde se genera anión superóxido. El daño oxidativo que se produce sobre el ADN mitocondrial es unas 15 veces superior al del ADN nuclear. Se han identificado más de veinte productos resultantes de la modificación oxidativa de las bases del ADN. La modificación por oxidación más importante y estudiada es la generación de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OH-dG), que conlleva transversiones (GC-TA) (Kasai, 2002). Estas alteraciones pueden conducir a mutaciones, aunque existen mecanismos de reparación generales y específicos que pueden reparar las bases modificadas (Valko *et al.*, 2004).

Las moléculas dañadas, principalmente ADN y agregados proteicos, así como mitocondrias y otros orgánulos alterados por las ROS deben ser eliminados por procesos de autofagia, para el mantenimiento de la homeostasis celular (Scherz-Shouval and Elazar, 2007). La acumulación de estos restos moleculares y celulares se asocia a diversos procesos fisiopatológicos importantes en mamíferos, como el envejecimiento celular, diabetes, arteriosclerosis, enfermedades cardiovasculares, carcinogénesis y ciertos trastornos neurodegenerativos (enfermedad de Parkinson, Alzheimer, etc) (Valko *et al.*, 2007). Además, a nivel celular, un drástico desequilibrio de la homeostasis redox puede ocasionar la muerte celular por autofagia, apoptosis o necrosis (Scherz-Shouval and Elazar, 2007; Circu and Aw, 2008).

Por último, hay que señalar que la presencia de ROS no sólo puede causar efectos deletéreos en las células, sino que a bajas concentraciones las ROS son necesarias como mensajeros en rutas de regulación y señalización celular. Así, se ha descrito la implicación de ciertas ROS en procesos de control de algunos factores de transcripción involucrados en crecimiento, diferenciación, inflamación y apoptosis (Arrigo, 1999; Dalton *et al.*, 1999; Morel and Barouki, 1999).

2. INDUCTORES EXÓGENOS DE ESTRÉS OXIDATIVO.

Como hemos comentado con anterioridad, en el metabolismo celular se producen especies reactivas de oxígeno y otras moléculas oxidantes. El 2 % del oxígeno utilizado en la mitocondria para la respiración celular, no llega a reducirse completamente y se transforma en radicales libres de oxígeno o peróxido de hidrógeno. Pero no sólo en la mitocondria se generan estas moléculas oxidantes. Además de por la acción de la citocromo oxidasa, el radical superóxido, también puede ser producido por la acción de otras enzimas oxidasas.

Introducción

La producción endógena de ROS y otras moléculas oxidantes se incrementa notablemente cuando las células o los organismos son expuestos a una amplia gama de compuestos químicos, generalmente considerados como contaminantes ambientales, que pueden desviar electrones individualmente de las cadenas transportadoras, generando radicales libres. Estos compuestos son de naturaleza química muy variada. Entre ellos cabe destacar las quinonas, nafto- y nitroquinolonas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y ciertos pesticidas como malathion o paraquat. También se ha asociado la producción de especies oxidantes con la presencia de metales y metaloides. Por otra parte, ciertos agentes físicos como las radiaciones pueden conducir a una situación de estrés oxidativo. Así, las radiaciones ionizantes producen ROS por radiolisis del agua, mientras que la luz ultravioleta origina H_2O_2 , mediante reacciones fotoquímicas. A continuación exponemos con más detalle los efectos de algunos metales pesados y metaloides y, otros agentes químicos oxidantes, que han sido utilizados en el presente trabajo.

2.1 Metales pesados y metaloides.

Existe una gran controversia en torno a la definición de metal pesado. En sentido estricto los metales pesados son aquellos elementos metálicos cuya densidad es superior a 5 g/cm^3 . Sin embargo, en la práctica, el término metal pesado se utiliza en sentido mucho más amplio, para designar a aquellos metales que son tóxicos o potencialmente tóxicos para los sistemas biológicos y además presentan gran relevancia como contaminantes ambientales (Gadd, 2000).

Hasta el presente, sólo se ha reportado citotoxicidad mediada por estrés oxidativo en algunos metales esenciales, no esenciales (Fe, Cu, Cr, Co, Va, Ni, Cd o Hg) y metaloides, como el arsénico (Valko *et al.*, 2005, Franco, 2009). La inducción de estrés oxidativo por metales pesados es un fenómeno complejo de carácter multifactorial. Para empezar, el comportamiento de los metales es diferente en función de que éstos presenten o no actividad redox (Liochev, 1999). Algunos de estos metales tienen actividad redox, es decir, más de una valencia o estado de oxidación, como Fe, Cu, Cr, Va y Co, mientras que otros sólo tienen una valencia como Cd, Pb, Hg y Ni, y carecen de reacciones de reciclaje redox (Valko *et al.*, 2005). Los metales pesados y metaloides como el arsénico pueden producir directa o indirectamente estrés oxidativo, mediante dos tipos básicos de mecanismos: la generación de especies oxidantes y la disminución de los sistemas antioxidantes (Stohs and Bagchi, 1995). Sin embargo, existen algunas características específicas, dependiendo de la naturaleza química y propiedades del metal (Valko *et al.*, 2005; Franco *et al.*, 2009; Limon-Pacheco and Gonsebatt, 2009).

Los metales con actividad redox pueden producir radicales libres por dos vías principales: la autooxidación y la vía de Fenton/Haber-Weiss. En presencia de oxígeno, algunos metales son capaces de auto-oxidarse y generar anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Yamamoto and Kawanishi, 1991) (Figura 3). En la vía de Fenton-Haber Weiss, en presencia de Fe u otros metales de transición como el Cu que catalicen la reacción, el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno se combinan para dar lugar al radical hidroxilo, más nocivo (Figura 4) (Halliwell and Gutteridge, 1999). La reacción Haber-Weiss, catalizada por hierro, parece ser el mecanismo principal de generación del radical hidroxilo en sistemas biológicos (Liochev, 1999).

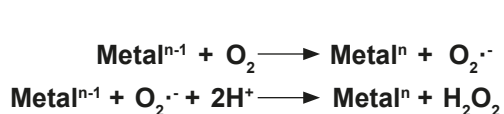


Figura 3. Autooxidación de metales. Los metales con más de una valencia son capaces de auto-oxidarse en presencia de oxígeno produciendo radical superóxido. Además, el superóxido producido, en condiciones de pH ácido, oxidan también el metal dando lugar a peróxido de hidrógeno.

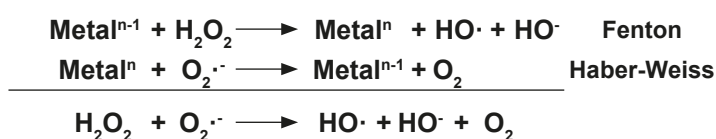


Figura 4. Reacciones de Fenton/Haber-Weiss. En la reacción de Fenton cationes metálicos se combinan con el peróxido de hidrógeno, de tal forma que el metal se reduce, pero se produce radical hidroxilo que es altamente reactivo. En la reacción de Haber-Weiss, el metal reducido se vuelve a oxidar en presencia de superóxido, de tal forma que se produce un “bucle” oxidando y reduciendo el metal y produciendo en cada ciclo radicales hidroxilo.

Además de su efecto directo por la producción de especies oxidantes, los metales pesados pueden ocasionar estrés oxidativo indirectamente, al inhibir o bien consumir los sistemas antioxidantes de defensa, lo cual produce una pérdida más o menos duradera de la homeostasis redox. El mecanismo es distinto según se trate de antioxidantes de carácter enzimático o no enzimático. La mayoría de las enzimas antioxidantes son metaloenzimas, es decir, requieren ciertos cationes metálicos para adoptar su conformación activa. Se ha propuesto que los cationes metálicos tóxicos (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{2+} , etc) podrían sustituir a los metales esenciales en sus sitios específicos de unión a la proteína, inactivándola, o bien, interrumpirían las interacciones de estas enzimas con sus respectivos cofactores (Kang, 1997).

Los cationes metálicos tóxicos tienen gran afinidad por los grupos tiólicos. La mayoría de antioxidantes no enzimáticos (glutación, metalotioneínas, etc) poseen una elevada proporción en residuos de cisteína que interaccionan fácilmente con estos cationes, quelándolos e impidiendo así que desencadenen sus efectos tóxicos. Esto conlleva una disminución en los niveles constitutivos de las defensas antioxidantes celulares que deben recobrase para que no se produzca una situación de estrés oxidativo (Kang, 1997).

Introducción

2.1.1 Cadmio (Cd): Es un metal no esencial y sin ciclo de reciclaje redox, que está considerado como uno de los contaminantes inorgánicos más tóxicos y por lo tanto, se ha incluido en la lista de contaminantes prioritarios de la EPA (*US Environmental Protection Agency*) y de la Unión Europea (Valko *et al.*, 2005; Bertin and Averbeck, 2006). Está considerado como carcinogénico por la IARC (*Internacional Agency for Research on Cancer*) (Waalkes *et al.*, 1984; Joseph, 2009). A nivel celular bloquea los canales de membrana para Ca^{2+} e inhibe diversas enzimas. En mamíferos, tiene propiedades genotóxicas que son consecuencia de la producción de ROS e interferencias en los mecanismos de reparación del ADN (Bertin and Averbeck, 2006). Además, este catión metálico bloquea la fosforilación oxidativa y la gluconeogénesis, produciendo importantes efectos negativos sobre el crecimiento y diferenciación celular, que pueden inducir apoptosis (Rana, 2008). En el hombre, la intoxicación con Cd tiene importantes consecuencias para la salud, entre las que cabe destacar, alteraciones óseas y renales, deficiencias en el sistema inmune, cáncer prostático y hepático (Bertin and Averbeck, 2006; Joseph, 2009).

Al menos en mamíferos, se ha comprobado que gran parte de la citotoxicidad y genotoxicidad del cadmio se debe a la formación de especies reactivas de oxígeno, principalmente anión superóxido y peróxido de hidrógeno, que causan importantes lesiones oxidativas en lípidos, diversas enzimas y en el ADN (Watjen and Beyersmann, 2004; Valko *et al.*, 2005; Bertin and Averbeck, 2006).

2.1.2 Arsénico (As): Metaloide no esencial que se encuentra en el ambiente tanto en forma orgánica como inorgánica y presenta dos estados de oxidación principales, arsenito (As^{3+}) o arseniato (As^{5+}). Es un potente agente mutágeno y carcinogénico que causa en el hombre graves alteraciones degenerativas, inflamatorias y neoplásicas en el sistema respiratorio, reproductor, nervioso e incluso en la piel (Franco *et al.*, 2009). Es un importante inhibidor enzimático del proceso respiratorio mitocondrial, capaz de generar especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, principalmente peróxido de hidrógeno, superóxido, oxígeno singlete, radical peroxil, óxido nítrico y por último, radicales peroxilo dimetil arsénico (Valko *et al.*, 2005; Rana, 2008). La producción de ROS y su toxicidad mitocondrial parecen jugar un papel muy importante en la citotoxicidad y el carácter carcinogénico de este elemento. Asimismo, son el origen de la inducción, a través de distintas rutas de señalización, de varias vías de apoptosis y además de muerte celular autofágica en las células de mamíferos afectadas (Rana, 2008; Franco *et al.*, 2009). Aunque todavía es objeto de intensa polémica, se ha sugerido la existencia de una ruta de biotransformación de arsénico inorgánico en células humanas, que incluye reducciones, oxidaciones y metilaciones, al igual que parece existir en otros animales superiores (Aposhian and Aposhian, 2006; Rana, 2008).

Actualmente, millones de personas consumen diariamente agua contaminada con arsénico en diversas partes del mundo.

2.1.3 Cobre (Cu): Es un metal esencial para la mayoría de los seres vivos, y que tiene carácter redox. Debido a su alto potencial redox, es cofactor de proteínas involucradas en una gran variedad de reacciones y procesos biológicos, incluyendo la fotosíntesis, respiración, metabolismo del hierro y función neurológica (Valko *et al.*, 2005). Como en el caso de otros metales esenciales, existe una regulación homeostática del contenido celular de cobre, de manera que se aseguren los niveles necesarios para el mantenimiento de la función biológica, evitando un exceso que puede ser tóxico. En general, se acepta que la toxicidad celular del cobre, se debe principalmente a la formación de ROS. El ión cúprico (Cu^{2+}), en presencia de reductores celulares, es reducido a ión cuproso (Cu^+) que es capaz de catalizar la formación del radical hidroxilo a partir de la descomposición de peróxido de hidrógeno, vía reacción de Fenton (Gaetke and Chow, 2003; Valko *et al.*, 2005). Este anión hidroxilo es altamente reactivo, siendo capaz de ocasionar una intensa peroxidación lipídica, que conlleva graves alteraciones a nivel de membrana y mitocondria. Además, el cobre produce roturas en las hebras de ADN y oxidación de bases (Mehta *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2009).

Se ha asociado un exceso de cobre con daños renales, hepáticos y neurológicos (parkinson, alzheimer, etc). Además, hay trastornos graves de origen genético relacionados con este metal, como los síndromes de Menkes y Wilson (Gaetke and Chow, 2003).

2.1.4 Zinc (Zn): El zinc es un metal esencial para el mantenimiento de la integridad de la membrana celular. Es componente de más de 300 metaloenzimas distintas que intervienen en muchos aspectos del metabolismo celular de lípidos, proteínas y carbohidratos. Se trata de un elemento esencial para el desarrollo óseo y de la musculatura esquelética, que está implicado en múltiples procesos como mensajero inter e intracelular. Por estas razones, como en el caso del cobre, existe también una homeostasis celular para el zinc, sometida a complejos circuitos reguladores (Valko *et al.*, 2005; Formigari *et al.*, 2007). Tradicionalmente se ha asignado al zinc una función antioxidante en la protección de las células frente al daño producido por los radicales libres, mediante distintos mecanismos posibles:

- 1) Inducción y mantenimiento del nivel adecuado de metalotioneínas (MTs), que también actúan como antioxidantes,
- 2) Como componente de la enzima superóxido dismutasa (SOD Cu-Zn),
- 3) Por interacción con moléculas ricas en grupos tiólicos, distintas de las MTs, e
- 4) Interaccionando con otros metales con actividad redox, como el cobre y el hierro, retardando así los procesos oxidativos (Formigari *et al.*, 2007; Bell and Vallee, 2009).

Introducción

Sin embargo, a elevadas concentraciones se comporta como oxidante y puede inducir o acelerar la apoptosis, en vez de inhibirla (Truong-Tran *et al.*, 2001; Formigari *et al.*, 2007).

2.1.5 Plomo (Pb): Es un metal con un único estado de oxidación (Pb^{2+}) que carece de función biológica. Por el contrario, puede causar graves alteraciones en los sistemas hematopoyético, renal y esquelético de animales superiores, aunque la diana principal de su toxicidad es el sistema nervioso. La toxicidad del plomo incluye varios mecanismos: afecta principalmente a los flujos celulares de Ca^{2+} , también produce especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, y altera las características biofísicas de la membrana (Marchetti, 2003; Verstraeten *et al.*, 2008). La acción prooxidante del plomo es consecuencia de varios mecanismos que incluyen la inhibición enzimática y una interacción con fosfolípidos de membrana, que facilita la propagación de la peroxidación lipídica y la disminución de antioxidantes. Además, el plomo induce la generación de anión superóxido e incluso es capaz de unirse a este radical, formando un complejo más reactivo y oxidante (Ahamed and Siddiqui, 2007; Verstraeten *et al.*, 2008).

2.2 Herbicidas: Paraquat.

El paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) (Figura 5) es un herbicida de nitrógeno cuaternario no selectivo que se ha utilizado ampliamente hace décadas y cuya utilización está prohibida en la actualidad, debido a su toxicidad en mamíferos. En plantas, interfiere en los sistemas de transferencia electrónica, inhibiendo la reducción del NADP^+ a NADPH durante la fotosíntesis. Esta inhibición causa la formación de anión superóxido y oxígeno singlete, así como radicales hidroxilo y peroxilo (Suntres, 2002). Sus mecanismos de toxicidad en animales y hongos son principalmente dos vías: la generación de radicales superóxido, que conlleva la producción de otros radicales y especies oxidantes, o la oxidación del NADPH , de tal forma que disminuye el poder reductor (Suntres, 2002). Además, interfiere en los sistemas antioxidantes dependientes de glutatión y tioredoxina, alterando el equilibrio redox intracelular, lo que puede conducir a un incremento del estrés oxidativo y finalmente, ocasionar la muerte celular por apoptosis o necrosis (Takizawa *et al.*, 2007). En mamíferos, la exposición a paraquat causa daños neuronales, debidos a estrés oxidativo, proceso clave en diversos trastornos neurodegenerativos (McCarthy *et al.*, 2004).

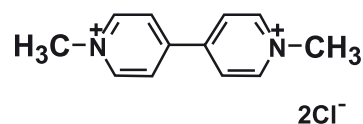


Figura 5. Paraquat. Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo.

2.3 Quinonas: Menadiona.

Las quinonas son una clase de compuestos químicamente muy diversos, que desempeñan múltiples funciones, con gran interés metabólico, toxicológico y farmacológico. Así, hay quinonas que actúan como pigmentos, antibióticos, vitaminas (tipo K) y coenzimas. Estos compuestos pueden experimentar la reducción por uno ó dos electrones, en reacciones catalizadas por muy diversas enzimas, generando las correspondientes semiquinonas. Además, las quinonas tienen un carácter electrofílico fuerte y son capaces de reaccionar con grupos tiólicos de proteínas o antioxidantes no proteicos, como el glutatión (Castro *et al.*, 2008).

La menadiona o vitamina K₃ (2-metil-1,4-naftoquinona) es una quinona que se suele utilizar para inducir experimentalmente estrés oxidativo (Chiou and Tzeng, 2000). Aunque muchas quinonas pueden interaccionar directamente con antioxidantes no enzimáticos, la mayoría de ellas son reducidas enzimáticamente por flavoproteínas oxidoreductasas. En estas reacciones, la quinona, puede adquirir dos electrones y reducirse totalmente, para dar lugar a una hidroquinona (Figura 6). También puede ganar únicamente un electrón de forma que se genera un radical semiquinona (Figura 6). Estas semiquinonas son muy inestables y presentan una gran afinidad por el oxígeno, de tal forma que al oxidarse se regeneran en forma de quinonas, pero a su vez producen radicales superóxido. Por lo tanto, el estrés oxidativo generado por quinonas sigue dos vías principales; la primera es la disminución de poder reductor consumido en las reacciones de las oxidoreductasas, y la segunda es la producción de radical superóxido, que a su vez, iniciará la formación de otras especies oxidantes (Thor *et al.*, 1982) (Figura 6).

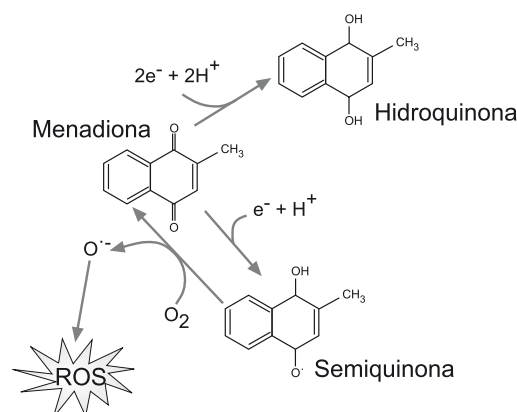


Figura 6. Reducción de la menadiona. La menadiona puede ganar 2 electrones y reducirse totalmente o adquirir tan sólo un electrón, producir una semiquinona que es inestable, y rápidamente se vuelve a oxidar generando un radical superóxido.

2.4 Dinitrohalobencenos: CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno).

El CDNB (Figura 7) es una pequeña molécula electrófila que pertenece al amplio grupo de dinitrohalobencenos. Como analizaremos posteriormente, el CDNB es el sustrato típico que se utiliza experimentalmente en estudios sobre las glutatión S-transferasas, ya que es un inductor clásico de la biosíntesis de estas enzimas (Armstrong, 1997). En mamíferos, los dinitrohalobencenos inducen un incremento de la actividad NADPH oxidasa, que conlleva la inhibición

Introducción

irreversible de la tioredoxina reductasa, enzima que se encarga de la reducción y por tanto, del reciclaje de tioredoxina, una de las principales moléculas antioxidantes en estos sistemas biológicos. Además, en la reacción de inactivación de la reductasa, se generan aniones superóxido (Arner *et al.*, 1995). El resultado final, de todos estos procesos es un incremento en la producción de ROS, debido a una disminución de las defensas antioxidantes, que favorece la aparición de estrés oxidativo (Nordberg and Arner, 2001).

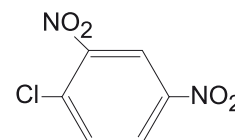


Figura 7. CDNB.
1-cloro-2,4-dinitrobenzeno.

3. DEFENSAS ANTIOXIDANTES.

En condiciones normales, la mayor parte de los radicales libres son eliminados mediante los sistemas antioxidantes celulares, que son de dos tipos: enzimáticos y no enzimáticos.

En la estructura de los distintos elementos redox que componen los sistemas de defensa antioxidantes hay dos aminoácidos que tienen una mayor importancia, que son la cisteína (Cys) y la metionina (Met). Su importancia radica en que, la cisteína presenta un grupo tiol y la metionina un grupo tioéter, grupos que son capaces de oxidarse y reducirse de forma reversible. El grupo más importante, que se oxida con mayor frecuencia, es el grupo tiólico (-SH) de la cisteína (Jones, 2008). La Cys por sí sola se auto-oxida rápidamente, por lo que tiene que protegerse formando parte de otras moléculas (Fahey, 2001). Así, forma parte de numerosas proteínas estructurales o enzimáticas, como por ejemplo, caspasas, kinasas, fosfatasa, proteasas y actina. Además, los residuos de Cys son frecuentes en los centros activos de proteínas involucradas en procesos de detoxificación, como las metalotioneínas, tioredoxinas, glutatión transferasas, citocromos P-450 y peroxirredoxinas. Estas proteínas son sensibles a la oxidación y tienen capacidad para interactuar con moléculas electrofílicas y/o cationes metálicos. La oxidación reversible de los grupos tiólicos aminoácidos, hasta disulfuros y residuos de ácido sulfanílico, va a regular funciones biológicas mediante tres vías generales:

- 1) Alterando los residuos de cisteína del centro activo de la enzima,
- 2) Alterando las posibles interacciones macromoleculares, y
- 3) Regulando la actividad enzimática, a través de una modificación alostérica de la cisteína (Jones, 2008). Por otra parte, hay que señalar que el aminoácido selenocisteína también puede oxidarse, aunque este proceso es menos frecuente que los anteriores.

Sin embargo, hay enzimas dependientes de selenio, que ocupan un lugar clave en las rutas antioxidantes del glutatión y la tioredoxina.

Los antioxidantes no enzimáticos son un grupo de moléculas de naturaleza muy diversa entre las que se incluyen el tripéptido glutatión y la tioredoxina (que analizaremos con mayor detenimiento posteriormente), así como ascorbato, ciertas vitaminas (C y E) y pigmentos carotenoides (Valko *et al.*, 2006). En este grupo también se incluyen las metalotioneínas, proteínas, en general, de bajo peso molecular y ricas en dominios de Cys, cuya función principal es la quelación de ciertos cationes metálicos. Aunque también estas proteínas pueden actuar como antioxidantes (Bell and Vallee, 2009).

Los sistemas antioxidantes enzimáticos están formados por un grupo de enzimas que actúa de forma coordinada (Figura 8). Estas enzimas están implicadas fundamentalmente en la inactivación del radical superóxido y el peróxido de hidrógeno. En este grupo se incluyen las siguientes:

SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD): Esta enzima transforma el radical hidroxilo en peróxido de hidrógeno (Figura 8). Existen 4 clases de SOD en función del metal que necesiten para ejercer su función. Una es dependiente de Cu y Zn, y generalmente se localiza en el citosol de todas las células eucariotas, en los cloroplastos de plantas y también está presente en algunos procariotas. La segunda es dependiente de Mn y se encuentra en procariotas y en mitocondrias. Otra clase es la SOD dependiente de Fe, que se ha identificado en procariotas, algas y en los cloroplastos de algunas plantas superiores. Por último, existe una clase de SOD que requiere Ni y que hasta el momento ha sido detectada tan sólo en el género bacteriano *Streptomyces* (Scandalios, 2005).

CATALASA (CAT): Elimina el peróxido de hidrógeno, transformándolo en agua y oxígeno molecular (Figura 8). Es la enzima mayoritaria de los peroxisomas de células eucariotas, aunque se localiza también en otros compartimentos celulares. La gran ventaja de esta enzima es que es capaz de degradar el peróxido de hidrógeno sin consumir equivalentes reducidos (Scandalios, 2005).

PEROXIDASA (Px): Elimina hidroperóxidos, tanto orgánicos como inorgánicos, a expensas de otra molécula que cede poder reductor (Figura 8), como por ejemplo el glutatión. En este caso se denominaría glutatión peroxidasa.

GLUTATIÓN REDUCTASA (GR): Reduce el glutatión oxidado a expensas de poder reductor, cedido por el NADPH.

TIORREDOXINA REDUCTASA (TxR): Reduce la tioredoxina oxidada con electrones cedidos por el NADPH.

Introducción

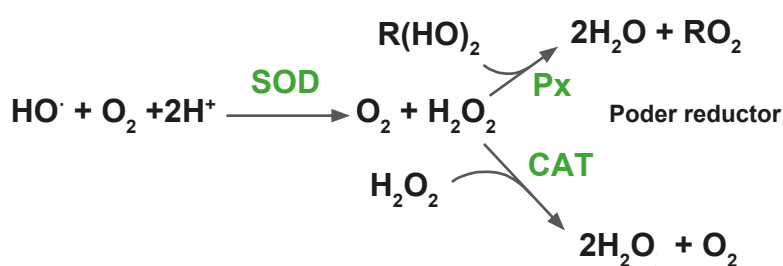


Figura 8. Reacciones coordinadas de los antioxidantes enzimáticos. SOD: superóxido dismutasa, PX: peroxidasa, CAT: catalasa.

En la Figura 9 se muestra la distribución de distintos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en los diferentes compartimentos celulares.

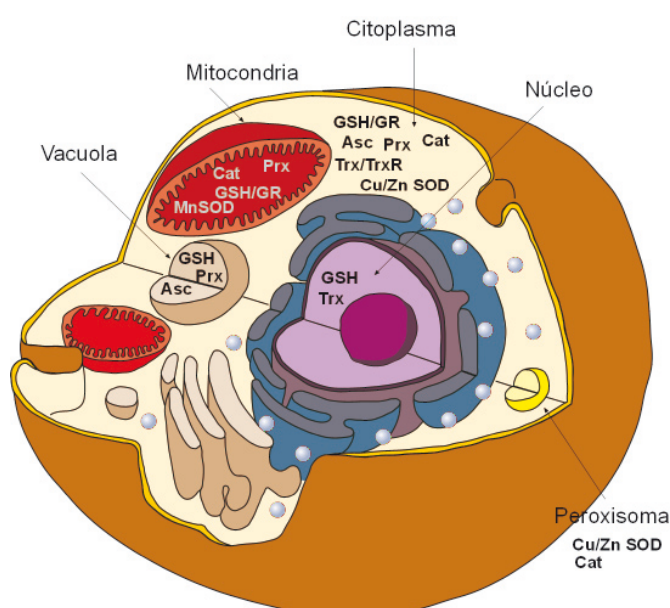


Figura 9. Localización de los sistemas antioxidantes en la célula. Asc: ascorbato, Cat: catalasa, GSH: glutatión, GR: glutatión reductasa, Prx: peroxirredoxina, SOD: superóxido dismutasa, Trx: tioredoxina, TrxR: tioredoxina reductasa.

Esta división clásica de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos no nos permite visualizar claramente las interacciones que se establecen entre ellos, imprescindibles para el mantenimiento de los circuitos celulares redox. Por esta razón, en este trabajo, se expondrán las características de los distintos antioxidantes estudiados, agrupándolos por sistemas funcionales. Cada uno de estos sistemas comprende uno o más péptidos con actividad redox, y la enzima encargada de su reciclaje o regeneración celular. Cada enzima cataliza la reducción específica del péptido oxidado y por tanto, no funcional, a su estado activo o funcional. Analizaremos principalmente los dos sistemas más importantes para el mantenimiento de los circuitos celulares redox; el sistema dependiente del glutatión y el sistema dependiente de tioredoxinas. Además, se expondrán las características fundamentales de un sistema antioxidante, que se considera específico de algunos protozoos parásitos, como es el sistema del tripanotión. Este sistema puede ser alternativo al del glutatión en algunos tripanosomátidos.

3.1 Sistema antioxidante dependiente de glutatión.

Este sistema está formado por el glutatión, y la enzima encargada de reducir al glutatión, denominada glutatión reductasa. También se incluye en este sistema a las glutatión transferasas, enzimas relacionadas con el glutatión y con una función en la detoxificación de metales, compuestos xenobióticos y otros contaminantes ambientales. Finalmente, se hace una breve caracterización de las glutatión peroxidasas y glutarredoxinas. Estas últimas enzimas dependientes de glutatión, también pueden ser recicladas por otras moléculas y presentan gran semejanza estructural con las tioredoxinas.

3.1.1 Glutatión (GSH).

En 1888 de Rey-Pailhade, trabajando con levaduras, descubrió una sustancia que reaccionaba de forma espontánea con el azufre, produciendo ácido sulfhídrico y le puso el nombre de *philotion* (avidez por el azufre). En 1921, fecha posterior a la caracterización del enlace peptídico, Hopkins consiguió aislar la sustancia descrita por de Rey-Pailhade y concluyó que este compuesto era un dipéptido formado por glutamato y cisteína. Le cambió el nombre y lo denominó glutatión (GSH), haciendo referencia al glutámico unido al grupo tiólico de la cisteína. En 1925, el grupo de Kendall demostró que el GSH se trataba de un tripéptido ya que además de glutámico y cisteína, contenía glicina. Poco tiempo después, en varios laboratorios y por distintos procedimientos se determinó la estructura química del GSH como, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina (Meister, 1988) (Figura 10).

El glutatión (GSH) es el principal compuesto tiólico no proteico presente en todos los organismos aerobios desde las bacterias (Fahey, 2001), hongos, plantas (Hell, 1997) hasta los animales (Meister and Anderson, 1983). Normalmente, se encuentra en un rango de concentración entre 1 y 10 mM y el 98 % del mismo, se presenta en su forma reducida. La importancia del GSH se debe principalmente a dos características estructurales:

- La existencia de un enlace tipo γ entre el residuo de ácido glutámico y el de cisteína, que le confiere protección frente a la acción de las proteasas (Meister and Anderson, 1983).
- El grupo tiólico libre del residuo de cisteína. Como consecuencia de la oxidación del

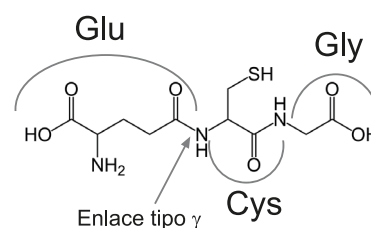


Figura 10. Glutatión. El glutatión (GSH) es un tripéptido formado por glutamato (Glu), cisteína (Cys) y glicina (Gly) con un enlace tipo γ entre los dos primeros aminoácidos.

Introducción

glutación, se forma un puente disulfuro entre dos moléculas de glutación, que da lugar al disulfuro de glutación (GSSG). El potencial redox del par GSH/GSSG es muy bajo, $E_0 = -240$ mV, lo que se traduce en que tiene una gran tendencia a oxidarse y por lo tanto, un elevado carácter reductor. De esta característica, se desprende su principal función como molécula antioxidante en el mantenimiento de la homeostasis celular redox, pero además desempeña otras múltiples funciones, que se explican brevemente en los siguientes apartados.

1) Mantenimiento del equilibrio redox intracelular. El potencial redox basal del par GSH/GSSG es progresivamente oxidado a través del ciclo biológico celular (Kirlin *et al.*, 1999). Existe una compleja red de reacciones redox dependientes del GSH, algunas de las cuales son imprescindibles para el mantenimiento del equilibrio tiólico intracelular. El GSH está involucrado en la formación y protección de los grupos tiólicos de proteínas y enzimas, así como de otras moléculas no proteicas, como la coenzima A. Como señalamos anteriormente, el aminoácido Cys forma parte del centro activo de muchas enzimas o es indispensable para el mantenimiento de su correcta conformación. El balance entre grupos tiólicos libres y puentes S-S es capaz de regular diversos procesos metabólicos, activando o inactivando determinadas enzimas. Algunas proteínas serán activas cuando sus grupos tiólicos se encuentren en forma reducida, mientras que otras, serán funcionales cuando los tengan oxidados. El GSH es capaz de interaccionar con determinados residuos del centro activo de muchas enzimas, mediante reacciones denominadas de glutationilación, catalizadas por enzimas transferasas de grupos tiólicos, como las glutarredoxinas (Jones, 2008). Recientemente, se ha sugerido la participación de otras enzimas dependientes de glutación en este proceso, como las glutación transferasas. La glutationilación es una modificación covalente, que desempeña un papel importante en el control de la actividad de determinadas enzimas y pone de manifiesto la importancia de la regulación mediada por modificaciones tiólicas.

2) Formación de desoxirribonucleótidos precursores del ADN. En organismos eucariotas, el glutación a través de la glutarredoxina, actúa como donador de electrones para la ribonucleótido reductasa de la clase uno, que proporciona los precursores reducidos para la síntesis de ADN. En procariotas, esta función puede ser desempeñada tanto por glutación como por tiorredoxina (Toledano *et al.*, 2007).

3) Transporte y almacenamiento de ciertos aminoácidos. La cisteína es un aminoácido que se autooxida rápidamente a cistina, generando radicales libres de oxígeno. Cuando este aminoácido pasa a formar parte del GSH se bloquea este proceso de auto-oxidación, y además puede ser transportada a diferentes compartimentos celulares (Meister and Anderson, 1983).

4) Detoxificación de compuestos xenobióticos y otros agentes tóxicos. La eliminación de muchos compuestos tóxicos para las células, como son diversos xenobióticos (PCBs, PAHs, dioxinas, furanos, etc), pesticidas, quinonas y metales pesados, entre otros, puede estar mediada por su unión (conjugación) con glutatión reducido. El GSH es capaz de conjugarse de forma espontánea o bien, a través de una reacción catalizada por la enzima glutatión transferasa, a diversos compuestos electrófilos, que pueden ser tanto contaminantes y xenobióticos, como productos del metabolismo celular. Los conjugados de GSH así formados, son más solubles y por lo tanto, menos tóxicos, lo que facilita su expulsión de la célula (Forman *et al.*, 2009). En apartados posteriores, consideraremos con más detalle a las glutatión S transferasas (GSTs), principales responsables de las reacciones de conjugación de glutatión. Sin embargo hay que destacar que el grupo tiólico del GSH tiene una alta afinidad por los cationes metálicos, incluyendo Hg^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , As^{5+} , As^{3+} , Pb^{2+} , Au^+ , Zn^{2+} , Cu^+ y Cu^{2+} . Las moléculas de GSH se unen a estos cationes metálicos, inmovilizándolos e impidiendo que interaccionen con estructuras y moléculas biológicas y por tanto, que puedan ejercer sus efectos tóxicos (Pastore *et al.*, 2003).

5) Detoxificación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS, NOS). La mitocondria es la principal fuente de especies reactivas de oxígeno. Una de las más importantes como es el peróxido de hidrógeno, que da lugar a aniones hidroxilo muy oxidantes y reactivos, puede ser reducido por dos enzimas muy distintas; catalasa y glutatión peroxidasa (GPx). Debido a que la catalasa se encuentra incluida en los peroxisomas, la mayor parte del peróxido mitocondrial es reducida por la GPx a expensas de GSH. Además, el glutatión es capaz de reaccionar directamente con diversos radicales libres, tanto de oxígeno como de nitrógeno, como por ejemplo, anión superóxido, hidroxilo, óxido nítrico, peroxinitrito e hidroperóxido, contribuyendo a evitar una situación celular de estrés oxidativo (Halliwell, 1999).

Como comentamos anteriormente, en condiciones fisiológicas normales, la concentración citosólica de glutatión oscila entre 1-10 mM, de la cual un 98 % se encuentra en forma reducida (GSH). En cada momento, esta concentración de GSH celular es el resultado de la diferencia entre los niveles resultantes de su biosíntesis *de novo* y de su reciclaje, por reducción del disulfuro de glutatión, y la concentración consumida de este metabolito, ya sea como cofactor de alguna enzima (GPx, GST) o por su propia oxidación.

3.1.1.2 Biosíntesis de glutatión.

El GSH es sintetizado por una ruta específica no ribosómica que se desarrolla en dos etapas, ambas dependientes de ATP. En una primera etapa, el glutamato y la cisteína se unen a

Introducción

través un enlace tipo γ en un proceso catalizado por la enzima glutamato cisteína ligasa, también denominada γ -glutamilcisteína sintetasa (GCL, EC 6.3.2.2) (Figura 11). En el segundo paso, se adiciona la glicina gracias a la acción de la glutatión sintetasa (GS, EC 6.3.2.3), dando lugar finalmente al tripéptido GSH. Esta ruta biosintética es esquematizada en la Figura 11.

A continuación, expondremos algunas de las características más importantes de estas enzimas presentes en distintos sistemas biológicos, haciendo algunas consideraciones sobre su evolución.

3.1.1.2.1 Glutamato cisteína ligasa (GCL).

Cataliza la formación del dipéptido γ -glutamilcisteína a partir de glutamato y cisteína, en una reacción dependiente de ATP (Figura 11). Se han descrito enzimas GCLs en muy diversos grupos de organismos, incluyendo muchas bacterias Gram negativas, protozoos, hongos filamentosos y levaduras, junto con plantas y animales. No poseen glutatión y por tanto, carecen de las enzimas implicadas en su biosíntesis *de novo*, los procariotas del dominio *Archaea*, muchas especies de bacterias Gram positivas y protistas carentes de mitocondrias, como *Entamoeba*, *Giardia* y *Trichomonas*.

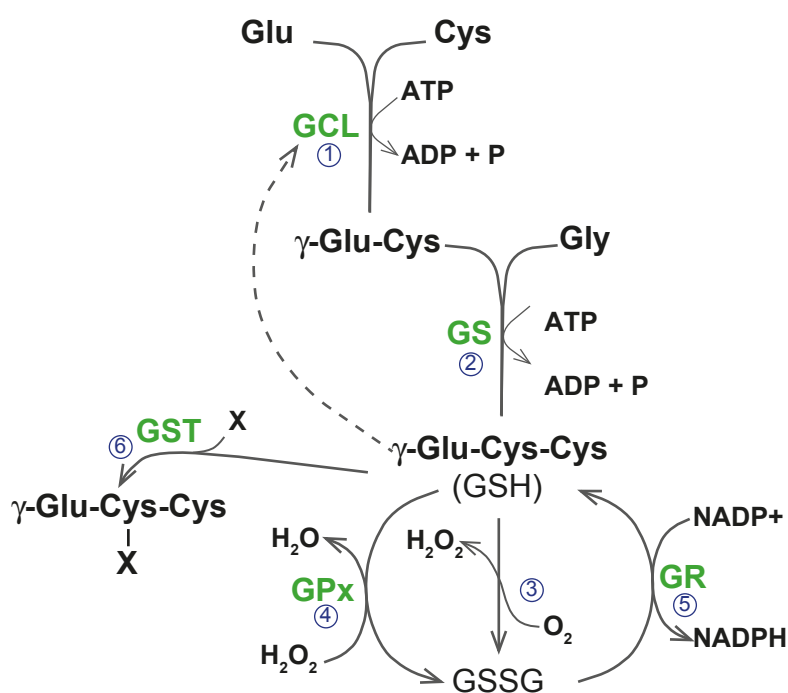


Figura 11. Metabolismo del glutatión. (1) GCL: glutamilcisteinil ligasa; (2) GS: glutatión sintetasa; (3) oxidación de GSH; (4) GPx: glutatión peroxidasa; (5) GR: glutatión reductasa; (6) GST: glutatión S-transferasa. La flecha discontinua indica la inhibición que ejerce el glutatión sobre la actividad de la GCL.

A pesar de que la presencia de esta enzima es vital para la supervivencia de los organismos que la presentan, las secuencias aminoacídicas, estructuras tridimensionales y mecanismos catalíticos no están muy conservados en los diferentes sistemas biológicos. En 2002, Copley y Dhillon dividieron la familia de la glutamato cisteína ligasa (GCL) en tres grupos distintos, según el grado de identidad entre sus secuencias aminoacídicas. Estos grupos no tienen otras relaciones significativas entre sí, si exceptuamos ésta característica. El grado de identidad de las secuencias dentro de cada grupo es muy variable y oscila entre 24-93% en el grupo 1, 32-98 % en el grupo 2 y 45-93 % en el grupo 3. Sin embargo, independientemente de su origen biológico, todas ellas presentan un motivo muy conservado, que parece ser la zona de interacción con GSH. El primer grupo comprende principalmente a las enzimas de γ -proteobacterias, como por ejemplo, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y algunas bacterias Gram positivas con bajo contenido en G+C, como *Clostridium acetobutylicum*. El segundo grupo incluye a todos los eucariotas no fotosintéticos, tanto unicelulares como pluricelulares, protozoos (Tripanosomátidos, Apicomplexa), hongos filamentosos, levaduras y animales vertebrados e invertebrados. Por último, el tercer grupo es muy diverso y en él se encuentran las GCLs de plantas, α -proteobacterias (*Rhizobium*), γ -proteobacterias (*Xylella*), bacterias Gram positivas con alto (*Mycobacterium*, *Streptomyces*) o bajo (*Streptococcus*) contenido en G+C y *Halobacterium*, única arquea que podría tener esta enzima. Además dentro de cada uno de estos tres grupos la variabilidad estructural enzimática es muy elevada. Así, dentro del segundo grupo, las enzimas de animales son diméricas y están formadas por una subunidad catalítica y otra subunidad reguladora, mientras que las enzimas del resto de organismos incluidos en el mismo grupo son monoméricas. Se han descrito GCLs heterodiméricas en nemátodos (*Brugia malayi* (Ghedini et al., 2007)), insectos (*Drosophila melanogaster* (Fraser et al., 2002)) y en vertebrados (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*) (Huang et al., 1993). Estas enzimas diméricas están formadas por una subunidad catalítica de aproximadamente 70 kDa, que sintetiza el dipéptido γ -GC, y una subunidad reguladora de 30 kDa, que es la encargada de modificar la afinidad de la enzima por sus diferentes sustratos en función de las condiciones del medio. Por el contrario, los microorganismos eucariotas incluidos en este segundo grupo (hongos y protozoos parásitos) presentan glutamato cisteína ligasas monoméricas. Un caso bien estudiado es la enzima de *Trypanosoma brucei*, que es un monómero de 77 kDa con un comportamiento cinético semejante al de la enzima dimérica de animales (Lueder and Phillips, 1996). Aunque en tripanosomátidos, el antioxidante principal no es el glutatión, sino un complejo derivado del mismo con espermidina, el GSH y la enzima involucrada en la primera etapa de su biosíntesis son esenciales para su crecimiento y ciclo biológico en el hospedador (Huynh et al., 2003). En los otros dos grupos restantes, primero

Introducción

y tercero, las glutamato cisteína ligasas son monoméricas con un peso molecular generalmente inferior a las diméricas, como ocurre por ejemplo en *E. coli*, cuya GCL tiene 58 kDa (Kelly *et al.*, 2002).

Hay que señalar que, las secuencias y estructuras enzimáticas son tan distintas y divergentes entre los tres grupos, e incluso dentro de cada grupo, que es difícil establecer relaciones evolutivas entre ellas. Los datos indican que los genes codificantes de las dos enzimas implicadas en la biosíntesis de glutatión han evolucionado separadamente. Con respecto al origen del gen de la glutamato cisteína ligasa, la hipótesis más plausible sostiene que esta enzima surgió por primera vez en cianobacterias, que serían las primeras células en necesitar esta protección proporcionada por el dipéptido γ -Glu-Cys frente a las ROS. Si esta hipótesis es correcta, el gen se habría transferido a proteobacterias y eucariotas, así como a algunas bacterias Gram-positivas y a una arquea (Copley and Dhillon, 2002). Una hipótesis alternativa considera que el gen codificante de la GCL de cianobacterias no es el progenitor de este gen en plantas. Dos hechos apoyarían esta última hipótesis; en primer lugar, las GCLs de plantas se sintetizan por genes nucleares de la célula, pero se localizan en los cloroplastos. En segundo lugar, sus secuencias poseen un mayor nivel de similitud con las enzimas de α -proteobacterias, que con respecto a las GCLs de cianobacterias (Ashida *et al.*, 2005).

La GCL es la enzima clave en la biosíntesis de GSH y está regulada a diferentes niveles (Franklin *et al.*, 2009; Lu, 2009). En todos los organismos, esta enzima es inhibida por su producto final, el GSH (Figura 11). En las enzimas formadas por dos subunidades, la unión de la subunidad reguladora a la catalítica incrementa la afinidad de esta última por el glutamato, y disminuye su afinidad por el GSH, impidiendo de esta forma, la existencia de una inhibición por producto final (Seelig *et al.*, 1984; Huang *et al.*, 1993). Además se han descrito mecanismos de regulación a nivel de expresión génica (Soltaninassab *et al.*, 2000; Krzywanski *et al.*, 2004). Así, existen numerosos trabajos sobre la regulación de la expresión de la enzima dimérica de humanos. Ambas subunidades, catalítica y reguladora, se inducen en respuesta a estrés oxidativo, aunque en grado variable. Esta variación de la proporción entre la subunidad catalítica y la reguladora es otra forma de control. La región 5'UTR (reguladora) de los genes codificantes de las dos subunidades de la GCL en el hombre está bien caracterizada. En ambos genes aparecen, entre otras, secuencias ARE (*Antioxidant Responsive Element*) y sitios de unión AP-1 (Mulcahy and Gipp, 1995; Erickson *et al.*, 2002; Dickinson *et al.*, 2004). Así, por ejemplo, el gen *GCL* de *Saccharomyces cerevisiae* es regulado por el factor de transcripción Yap-1 (similar al AP-1 de mamíferos), que activa igualmente los genes requeridos para la respuesta al estrés oxidativo (Wu and Moye-Rowley, 1994).

3.1.1.2.2 Glutación sintetasa (GS).

Es la enzima que adiciona glicina al dipéptido γ -GC, en una reacción dependiente de ATP, para dar lugar al GSH (Figura 11). Su función catalítica comienza por una fosforilación, dependiente de ATP, del sustrato L- γ -glutamyl-L-cisteína, originándose un intermediario acil-fosforilado al que se une la glicina, con la pérdida de un fosfato inorgánico (Pocsi *et al.*, 2004).

Como ocurre con la GCL, hay diferencias estructurales entre las GSs, procedentes de diversos sistemas biológicos. Así, las secuencias de las GSs existentes en eucariotas pluricelulares y unicelulares, como animales, plantas y levaduras comparten unos niveles de identidad elevados, pero son muy diferentes a las de las de bacterias. Por otro lado, las GSs de plantas y animales son homodímeros, con un peso molecular por subunidad comprendido entre 56 y 77 kDa. Sorprendentemente, aunque la identidad entre las secuencias de las glutación sintetetas humanas y de *Escherichia coli* es muy baja, estas enzimas presentan bastante similitud estructural, lo que indica que podrían estar relacionadas (Copley and Dhillon, 2002). Por el contrario, en levaduras son heterotetrámeros y están formadas por dos tipos de subunidades distintas, con 26-24 y 32-33 kDa, respectivamente (Pocsi *et al.*, 2004). Independientemente de su procedencia biológica, todos los monómeros tienen una conformación en dominios *ATP-grasp*, típicos de enzimas que catalizan reacciones en las que se forman enlaces peptídicos de forma independiente a la de la síntesis ribosomal. Al menos existen 15 familias distintas de proteínas *ATP-grasp*, que catalizan la formación de un enlace entre el grupo carboxilo de un sustrato y el grupo amino, imino o tiol de un segundo sustrato. Con respecto a su origen evolutivo, los análisis comparativos parecen indicar que las glutación sintetetas de eucariotas no parecen haber evolucionado directamente de una glutación sintetasa bacteriana sino, que ambas parecen tener un ancestro común (Copley and Dhillon, 2002).

Las características enzimáticas y los mecanismos de regulación de la glutación sintasa han sido mucho menos estudiados que en el caso de las glutamylcisteína ligasas. Los escasos datos existentes indican que la subunidad catalítica de la GCL y la GS están reguladas de manera coordinada. Sin embargo, a diferencia de la primera, la enzima glutación sintetasa no presenta un mecanismo de regulación postranscripcional (Lu, 2009). Esto se debe a que no se trata de una enzima clave, sino totalmente dispensable en condiciones normales de crecimiento, porque al menos, en levaduras, el dipéptido formado por la GCL, es capaz de asumir, en parte, las funciones del GSH (Grant *et al.*, 1997).

Introducción

3.1.1.2.2 Fusión glutamato cisteína ligasa –glutación sintetasa (GCL-GS).

En algunas bacterias se han descrito enzimas bifuncionales, capaces de realizar ambas etapas de la síntesis de GSH, tanto la unión del glutamato y la cisteína como la adición de la glicina. Este tipo de enzimas está bien descrita en tres especies bacterianas Gram positivas, *Streptococcus agalactiae* (Janowiak and Griffith, 2005), *Listeria monocytogenes* (Gopal et al., 2005) y *Enterococcus faecalis* (Janowiak et al., 2006) y en la bacteria Gram negativa, *Pasteurella multocida* (Vergauwen et al., 2006). Además, en los genomas de otras 15 bacterias, la mayoría de ellas Gram positivas, se han localizado genes homólogos que podrían codificar para GCL-GS (Janowiak et al., 2006). En el extremo N-terminal de la GCL-GS se sitúa el dominio γ -glutamil-cisteína ligasa y fusionado a éste, se encuentra un dominio *ATP-grasp*, más parecido a enzimas D-Ala-D-Ala ligasas que a glutación sintetisas. Hay que destacar que estas enzimas pierden la capacidad de regulación mediante inhibición por glutación, de tal modo, que los organismos que las poseen, acumulan grandes cantidades del tripéptido (Vergauwen et al., 2006).

3.1.2 Glutación reductasa (GR).

La glutación reductasa (EC1.6.4.2) es la enzima encargada de reducir el disulfuro de glutación y de esta forma regenerar el glutación a la forma funcional antioxidante (Figura 11). Es una enzima ubicua que se localiza en todos los organismos que poseen glutación (Meister and Anderson, 1983). Se incluye en la misma familia que la tiorredoxina reductasa, tratándose de una flavoproteína nucleótido de pirimidina disulfuro óxido reductasa. Por lo tanto, estructuralmente es semejante a las tiorredoxina reductasas de alto peso molecular (H-TrxR), que analizaremos posteriormente. Sin embargo, las GRs carecen del par de cisteínas en el extremo C-terminal de la molécula, las cuales configuran un segundo centro activo en las H-TrxRs (Figura 12). La GR es capaz de reducir de forma específica glutación oxidado (GSSG) y en algunos casos, el disulfuro que existe entre una molécula de glutación y el dipéptido γ -glutamilcisteína (Meister and Anderson, 1983), pero no posee tan amplio espectro de sustratos como la TrxR. La primera vez que se observó la actividad de esta enzima fue hacia 1930, y posteriormente se ha aislado de diversas fuentes desde bacterias hasta animales (Avval and Holmgren, 2009).

En animales se ha comprobado la existencia de dos isoformas de GR, una citoplasmática y otra mitocondrial, pero ambas enzimas están codificadas por el mismo gen. Este gen muestra dos posibles codones de inicio para la traducción, separados por una región de 43 aa, rica en residuos de arginina, que funciona como secuencia señal para la translocación del polipéptido a la mitocondria (Kelner and Montoya, 2000).

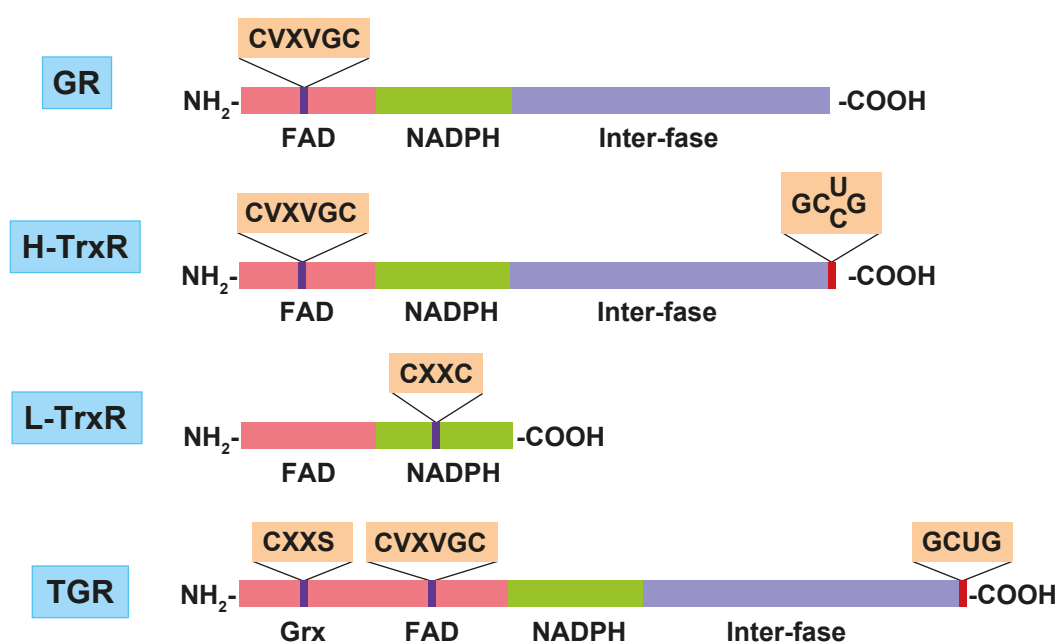


Figura 12. Estructura de las enzimas oxidorreductasas. GR: glutatión reductasa, H-TrxR: tioredoxina reductasa de alto peso molecular, L-TrxR: tioredoxina reductasa de bajo peso molecular, TGR: tioredoxina glutatión reductasa, Grx: glutarredoxina, X: cualquier aminoácido diferente de cisteína. En color rosa aparecen los dominios de unión al FAD, en color verde los dominios de reconocimiento del NADPH. En color rojo la pareja de cisteínas terminales.

La síntesis de GR está regulada por varios tipos de estrés y es inducida especialmente por estrés oxidativo y nitrosativo (Minami *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2006; Tekman *et al.*, 2008). Además se ha comprobado que la sobreexpresión de esta enzima protege frente al daño producido por ROS en microorganismos, animales y plantas (Grant *et al.*, 1996; Mockett *et al.*, 1999; Fujii *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003).

3.1.3 Glutatión transferasas (GSTs).

Las glutatión transferasas (GSTs), antes conocidas por glutatión S-transferasas, (EC 2.5.1.18) son una superfamilia de proteínas multifuncionales. Como su nombre indica, su actividad primaria es la transferencia y unión de glutatión reducido a compuestos no polares que contienen un átomo de carbono, nitrógeno o azufre electrofílico (Figura 11). Como consecuencia de esta función, contribuyen a la detoxificación o metabolismo de drogas, pesticidas, compuestos xenobióticos y otros productos que causan estrés oxidativo y suelen considerarse como contaminantes ambientales (Hayes *et al.*, 2005; Oakley, 2005). También intervienen en procesos de detoxificación de agentes tóxicos de origen natural, como las toxinas de plantas y hongos filamentosos (Sheehan *et al.*, 2001). Además, algunas pueden tener actividades peroxidasas, isomerasas y tiol-transferasas (Board *et al.*, 2000). Existen incluso algunas glutatión transferasas

Introducción

que carecen de actividad catalítica y sólo actúan como proteínas transportadoras de GSH o de determinados ligandos (Axarli *et al.*, 2004).

Las GSTs están relacionadas con otras familias de proteínas, como las glutarredoxinas (Grxs), canales intracelulares de cloro (CLIC), dehidroascorbato reductasas (DHAR), glutatión peroxidasas (Gpx) y el factor de elongación de proteínas eucariotas (eEF1B γ). Todas estas familias de proteínas tienen en común que presentan en su estructura un dominio tipo tiorredoxina.

Las GSTs se encuentran ampliamente distribuidas en los seres vivos y están presentes, tanto en organismos pluricelulares, como en microorganismos unicelulares, procariotas y eucariotas. Esta superfamilia se divide en 4 familias distintas (Pearson, 2005), según su origen o localización celular: GSTs citosólicas, mitocondriales, microsomales (MAPEG: "*Membrane Associated Proteins involved in Eicosanoid and Glutathione metabolism*") y GSTs FosA (proteínas bacterianas de resistencia a fosfomicina). Las dos primeras, citosólicas y mitocondriales, son las que guardan mayor relación entre sí.

3.1.3.1 GSTs citosólicas (GSTc).

La familia de GSTs citosólicas, es la que cuenta con mayor número de representantes, de tal forma, que cada especie posee decenas de genes potencialmente codificantes para enzimas de esta familia. Por ejemplo, en distintas especies de mamíferos se han identificado 15 o 20 genes diferentes codificantes de GSTs citosólicas (Hayes *et al.*, 2005), entre 40 y 60 en plantas (McGonigle *et al.*, 2000), 12-15 en bacterias (Vuilleumier and Pagni, 2002), 2-4 en hongos (McGoldrick *et al.*, 2005) y 30-35 en insectos (Tu and Akgul, 2005). Además de la gran cantidad de isoformas de una determinada GST que puede presentar una especie, las GSTc presentan polimorfismos intraespecíficos, documentados ampliamente en el caso de mamíferos, que contribuyen a las diferencias entre individuos en las respuestas frente a agentes tóxicos (Hayes *et al.*, 2005).

Desde el descubrimiento de la primera GSTc en hígado de rata (Booth *et al.*, 1961), no ha cesado la descripción de nuevas GSTc de distintos seres vivos y la aparición de estudios que intentan establecer una clasificación para esta familia de enzimas. En 1985, Mannervick describió tres clases diferentes de GSTs citosólicas: Alpha, Mu y Pi (Mannervik *et al.*, 1985). Posteriormente, el grupo de Meyer describió una nueva clase, a la que denominó Theta (Meyer *et al.*, 1991). Cuatro años más tarde, se caracterizó una nueva clase denominada Sigma, encontrada en el calamar (Ji *et al.*, 1995). Así sucesivamente, se fueron publicando propuestas de clases nuevas, de manera que en la revisión publicada en el año 2000 ya se recogían 7 clases de GSTs

citosólicas (Strange *et al.*, 2000). Actualmente, las GSTs citosólicas se distribuyen en, al menos 15 clases distintas en función de su secuencia aminoacídica, estructura tridimensional, actividad y propiedades inmunológicas. Se considera que dos GSTs pertenecen a la misma clase, cuando la identidad de la secuencia aminoacídica es superior al 40 %. Hay 3 clases (Zeta, Theta y Omega) que se consideran generales porque se encuentran en todos los filos, 4 clases (Sigma, Alpha, Mu y Pi) son específicas de animales y 2 clases (Delta y Epsilon) específicas de insectos (Tu and Akgul, 2005; Udomsinprasert *et al.*, 2005). Además, hay 3 clases (Phi, Tau y Lambda) que son específicas de plantas (Edwards and Dixon, 2005). Por último, se han establecido otras clases de GSTs que sólo se han aislado de microorganismos; una (Gamma) de hongos (Sato *et al.*, 2009); y en procariotas, una (Beta) de bacterias (Allocati *et al.*, 2009) y otra (Chi), que procede exclusivamente de cianobacterias (Wikteliu and Stenberg, 2007). Esta clasificación podría cambiar drásticamente en un futuro, porque numerosos trabajos, realizados con microorganismos, apuntan a la existencia de nuevas clases de GSTs, como por ejemplo en el protista ciliado *Blepharisma japonicum*, donde se han analizado dos GSTs que no se ajustan a ninguna de las clases descritas anteriormente (Takada *et al.*, 2004; Takada and Matsuoka, 2008). El caso más extremo lo encontramos en hongos y levaduras. Los escasos estudios realizados sobre las GSTs de levaduras y hongos filamentosos indican que las glutatión transferasas fúngicas forman un grupo especialmente diverso, estructural y funcionalmente. Los hongos poseen enzimas GSTs pertenecientes a las clases Theta, Zeta, Omega y Gamma, ésta última es específica de este grupo. Además, poseen una serie de proteínas que parecen presentar actividad GST, como son EF1B γ , Ure2p, MAK16 y otras enzimas no clasificadas en ninguno de estos grupos (McGoldrick *et al.*, 2005). En la Tabla 1, se muestra el número total de tipos de genes codificantes de diferentes tipos de GSTs que presentan algunos organismos representativos.

Existe una normativa para la denominación de las GSTs, que está de acuerdo con los principios del Comité para la Nomenclatura de Genes Humanos. Cada subunidad de GST o el gen que la codifica, debe ser nombrado por dos letras que hacen referencia a la especie a la que pertenece (Hs: *Homo sapiens*), seguido de el término GST, una letra latina que hace referencia a la clase (A: Alfa) y un número, para distinguir entre los diferentes genes o monómeros de la misma clase presentes en el mismo organismo. Así, la proteína HsGSTA1 hace referencia al monómero 1 de GST de clase Alfa aislada de humanos. Si queremos referirnos a la proteína completa, que está formada por dos subunidades, utilizaremos la denominación HsGSTA1-1 para aludir a la enzima GST formada por dos monómeros de tipo Alpha 1.

En algunos sistemas biológicos, los genes codificantes de GSTs parecen estar agrupados en determinadas regiones cromosómicas. Esto sucede en las GSTs de la misma clase, proceden-

Introducción

tes de humanos (Morel *et al.*, 2002), insectos (Ranson *et al.*, 1998) y plantas (Wagner *et al.*, 2002). En bacterias, las GSTs se localizan agrupadas en operones concretos involucrados en la degradación de determinados compuestos (Vuilleumier and Pagni, 2002).

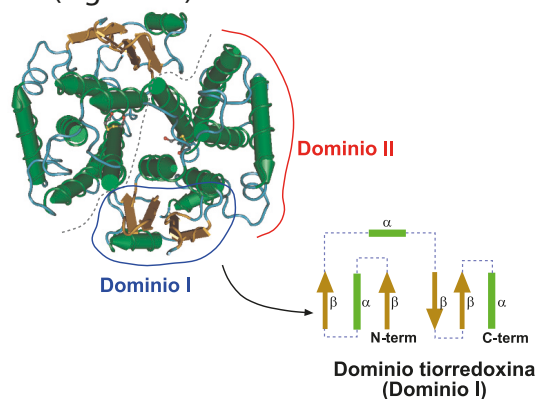
CLASE	VERTEBRADOS			INSECTOS	PLANTAS	
	<i>H. sapiens</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>
Theta	2	2	3	4	3	2
Zeta	1	1	1	2		3
Omega	2	2	2	4		
Sigma	1	1	1	1		
Alpha	6	6	6			
Mu	5	7	6			
Pi	1	1	2			
Tau					28	39
Phi					13	16
Lambda					2	1
Delta				10		
Epsilon				10		
Total	18	20	21	31	46	61

Tabla 1. Glutación S-transferasas en distintos organismos. En la tabla se representan el número de genes que codifican GSTs de cada clase que se han identificado en los organismos seleccionados.

Todas las GSTs citosólicas son proteínas homo o hetero diméricas, formadas por dos subunidades pertenecientes siempre a la misma clase, a excepción de alguna de las enzimas de la clase Lambda en plantas, que son activas en forma monomérica (Dixon *et al.*, 2002). Cada uno de los monómeros que conforma la proteína activa está compuesto por 200-250 aminoácidos, con un peso molecular de 23-30 KDa. Estas subunidades poseen dos dominios; el dominio N-terminal o dominio I, que es un dominio típico tipo tiorredoxina, y el dominio C-terminal o dominio II, formado por un número variable de hélices α . El dominio I está muy conservado en todas las clases de GSTs citosólicas, mientras en el dominio II es más variable, siendo el número de hélices alfa que lo conforman específico de cada clase (Figura 13).

Figura 13. Estructura de las enzimas GSTs (HsGSTA1-1).

La línea de puntos separa los dos monómeros de la enzima. La línea de color azul indica el dominio N-terminal o dominio I, con una estructura típica de tiorredoxina y la línea roja indica el dominio II o C-terminal. Este dominio se muestra al lado derecho, representando las hélices α con barras de color verde y las láminas β con flechas de color ocre.



Además, en cada subunidad proteica, se diferencian dos sitios de unión de ligandos, denominados G y H. El sitio G es el lugar de unión del GSH y está formado principalmente por residuos del dominio I. El sitio H, es el lugar de reconocimiento del sustrato y está constituido por residuos no polares del dominio II (Frova, 2006). El alto grado de variabilidad del dominio II entre las diferentes clases de GSTs, confiere a este grupo de enzimas, un amplio rango de posibles sustratos potencialmente reconocibles. Las interacciones entre las dos subunidades en la proteína activa, se establecen entre el dominio I de un monómero y el dominio II del segundo monómero. Cada monómero es catalíticamente independiente *in vitro*, sin embargo, todas las enzimas encontradas en la naturaleza son activas en forma dimérica (Sheehan *et al.*, 2001; Frova, 2006), a excepción de las anteriormente citadas GSTs de clase Lambda.

3.1.3.2 GSTs mitocondriales (GSTm).

Se descubrieron por primera vez en la matriz mitocondrial de células hepáticas de rata (Harris *et al.*, 1991). Desde esa fecha hasta la actualidad, se han aislado y caracterizado GSTm de múltiples especies de animales vertebrados e invertebrados, incluyendo mamíferos y el hombre (Morel *et al.*, 2004; Frova, 2006). Se localizan principalmente en mitocondrias, pero hay evidencias de su presencia en peroxisomas y constituyen la clase Kappa de las GSTs. Ambos orgánulos, mitocondrias y peroxisomas, están involucrados en el metabolismo lipídico y representan compartimentos subcelulares donde se generan cantidades notables de ROS, por lo que se piensa que las GSTm Kappa podrían tener funciones importantes en la β -oxidación de ácidos grasos y la detoxificación de peróxidos lipídicos (Frova, 2006).

En todas las especies animales, tanto la estructura de la proteína, como la organización de los genes que las codifican, están altamente conservadas, lo que podría indicar que desempeñan una función biológica importante (Jowsey *et al.*, 2003). La secuencia aminoacídica de estas proteínas no guarda grados de homología significativos con las GSTc, sino que es más similar a algunas GSTs bacterianas. La topología de su estructura secundaria está también más próxima a la de ciertas GSTs de bacterias que a las GSTs citosólicas. En cuanto a la estructura tridimensional proteica, tienen dos dominios como las GSTs citosólicas, el dominio I de tipo tiorredoxina y el dominio II α -helicoidal, pero en este caso, a nivel de la secuencia aminoacídica, el dominio II está inserto en el interior del dominio I (Robinson *et al.*, 2004).

Introducción

3.1.3.3 GSTs microsomales o MAPEG.

Las GSTs microsomales se denominan actualmente MAPEG ("*Membrane Associated Proteins involved in Eicosanoid and Glutathione Metabolism*") porque están asociadas a membranas y en su mayoría, están involucradas en la síntesis de eicosanoides, leucotrininas y prostaglandinas, catalizando reacciones de transferencia de GSH o de isomerización. Se trata de enzimas ubicuas, que se encuentran en muy distintos organismos dentro de la escala evolutiva, tanto eucariotas como procariotas, pero no se han descrito en arqueas (Frova, 2006). Actualmente, se reconocen cuatro clases distintas, que parecen ser insuficientes para explicar toda su diversidad. La mayoría de las especies bacterianas y de animales suelen presentar varios genes codificantes de MAPEG, pertenecientes a distintas clases, mientras que en plantas y en hongos, solo existe una MAPEG por especie, que suele ser de la clase III (Bresell *et al.*, 2005).

La estructura de las GSTs microsomales es totalmente diferente a la de las GSTs citosólicas y sus secuencias presentan una identidad inferior al 10 %. Además, los monómeros tienen una longitud muy inferior, con un promedio de 150 aminoácidos (Jakobsson *et al.*, 1999). La principal diferencia estructural de las MAPEGs es la presencia de cuatro dominios transmembrana, que no existen en las enzimas solubles. La estructura cuaternaria indica que estas enzimas son activas en forma homotrimérica, pero al contrario de lo que ocurre en las GSTs citosólicas, estos monómeros no son cinéticamente independientes y el trímero sólo es capaz de unir una molécula de sustrato y otra de GSH (Lengqvist *et al.*, 2004).

3.1.3.4 GSTs FosA.

Son metaloproteínas exclusivamente bacterianas, que confieren resistencia a fosfomicina. La fosfomicina es un antibiótico bactericida de amplio espectro y efectivo frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, que actúa a nivel de la biosíntesis del peptidoglucano de la pared bacteriana. Existen tres mecanismos de resistencia a este antibiótico, uno de ellos está mediado por las enzimas GSTs FosA, que transfieren GSH a la fosfomicina, inactivándola (Allocati *et al.*, 2009). Los genes codificantes para estas proteínas se pueden localizar, tanto en plásmidos, como en el cromosoma bacteriano (Rife *et al.*, 2002). Las GSTs bacterianas FosA son enzimas homodiméricas, con un peso molecular de 32 KDa y su actividad es dependiente de iones Mn^{2+} (Arca *et al.*, 1990).

3.1.3.5 Evolución y expresión de las GSTs.

Con respecto a la evolución de la superfamilia de las GSTs, el modelo evolutivo más aceptado, propone que la tiorredoxina sería el ancestro común de todas las GSTs, a partir del cual, partieron tres líneas evolutivas distintas, correspondientes a las GSTs solubles, las GST microsomaes y las proteínas FosA. Centrándonos en las GSTs solubles, el modelo evolutivo, basado en alineamientos de secuencias y la presencia de las diferentes clases de GSTc presentes en los distintos organismos, propone dos fases evolutivas distintas. La primera fase consistiría en la incorporación del dominio helicoidal (dominio II) (Figura 14). En las GSTs citosólicas este segundo dominio se adicionaría al extremo terminal de la tiorredoxina y en las GSTs mitocondriales (clase Kappa), el dominio helicoidal se introduciría dentro del dominio tiorredoxina (Frova, 2006). La segunda fase evolutiva está menos clara. Se piensa que las glutatión transferasas más antiguas podrían ser las GSTs monoméricas, como las GSTs de clase Lambda, y las GSTs diméricas habrían surgido más tarde en la evolución. Además, el modelo establece un orden de aparición en función de los cambios en los residuos que conforman el sitio activo de la enzima. Según este modelo, las GSTs diméricas más antiguas serían las de clase Beta y Omega y las más recientes, las clases Alpha, Mu y Pi, que son específicas de animales (Sheehan *et al.*, 2001) (Figura 14).

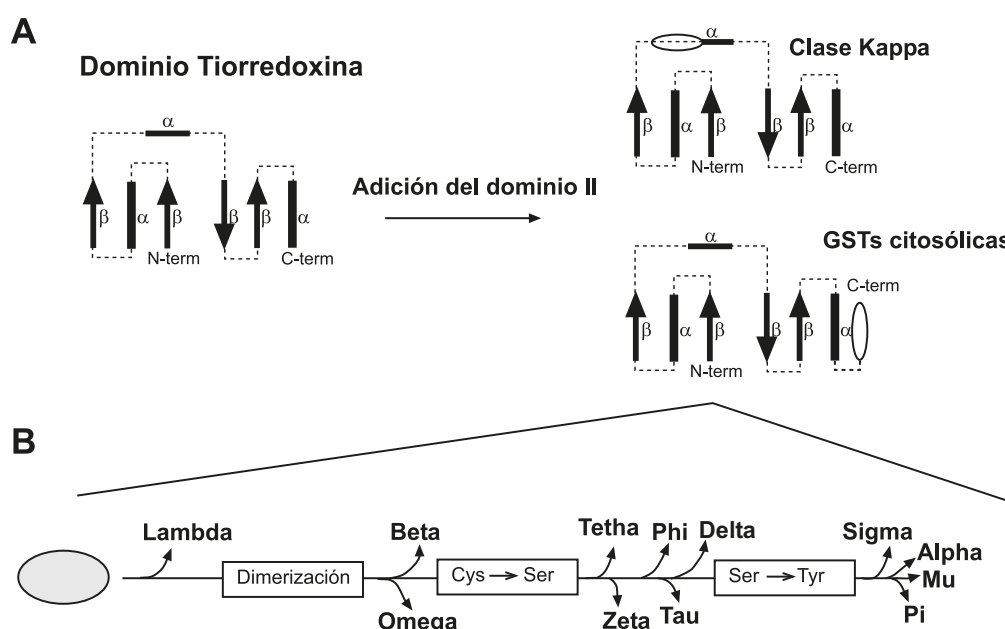


Figura 14. Modelo evolutivo de las enzimas GSTs. La evolución de las GSTs solubles se desarrolla en dos etapas. La primera etapa se muestra en la parte superior de la figura (A), y consistió en la adición de un dominio helicoidal a una tiorredoxina. En función del lugar en el cual se adicionó el dominio surgieron las GSTs citosólicas, si se añadía en el extremo C-terminal, o las GSTs mitocondriales (Kappa) si se intercalaban en el interior del dominio I. La segunda etapa de este modelo (B) sólo afecta a las GSTs citosólicas y se muestra en la parte inferior. Se piensa que la clase Lambda es la más antigua porque es monomérica. Tras la dimerización de estas enzimas, se producirían una serie de mutaciones en los aminoácidos esenciales (mostrados en el interior de los rectángulos) que darían lugar a las diferentes clases de GSTs citosólicas.

Introducción

Existen numerosos estudios sobre la regulación de la expresión de las GSTs citosólicas. El patrón de expresión es diferente en función del estado de desarrollo del organismo y sobre todo, en el caso de organismos pluricelulares, es específico de cada tejido. Por ejemplo, en humanos las GSTc de la clase Alpha alcanzan altos niveles en hígado y riñón, mientras que no aparecen en pulmón. Por el contrario, se han encontrado altos niveles de GSTP1-1 en cerebro y pulmón pero no en hígado (Eaton and Bammler, 1999). Se ha detectado una notable inducción en la expresión de los genes codificantes de estas enzimas tras el tratamiento con diversos agentes inductores de estrés, incluyendo compuestos xenobióticos, glucocorticoides y metales pesados entre otros. Además, se ha encontrado que el compuesto CDNB (1-cloro-2,4-dinitro-benceno), sustrato típico de las GSTs, es capaz de incrementar los niveles de expresión de alguna de estas enzimas (Burns *et al.*, 2005).

Los estudios experimentales realizados con organismos *knockout*, muestran que estos sistemas biológicos modificados son mucho más sensibles a infecciones bacterianas y a la exposición a diversos metales y agentes oxidantes. Además, en estos organismos con bajos niveles de GSTs, los tratamientos causaron también, un incremento en la expresión del resto de enzimas del sistema de defensa antioxidante (Raza *et al.*, 2002; Adamis *et al.*, 2004; Engle *et al.*, 2004; Dourado *et al.*, 2008). Por otra parte, se han descrito líneas de células tumorales resistentes a los tratamientos de quimioterapia, que poseen unos niveles incrementados de GSTs con respecto a las células normales (Ahmad *et al.*, 1997). Todos estos resultados corroboran las importantes funciones que desempeñan las glutatión transferasas en la defensa o resistencia frente a toda una gama de agentes tóxicos o causantes de estrés celular.

Se han descrito, algunas regiones 5'UTR reguladoras de diversas GSTs. En animales aparecen regiones ARE (Elementos de Respuesta Antioxidantes), regiones GRE (Elementos de Respuesta a Glucocorticoides), XRE (Elementos de Respuesta a Xenobióticos) (Eaton and Bammler, 1999), sitios de reconocimiento de AP-1 y, secuencias GATA (Schnekenburger *et al.*, 2003). En protozoos ciliados, sólo existe un estudio sobre la región promotora de dos GSTs presentes en el heterotrico *Blepharisma japonicum* (Takada and Matsuoka, 2008). La expresión de estos genes es inducida por la luz y en sus regiones reguladoras aparecen sitios de reconocimiento para el factor SKN-1 que está relacionado con la respuesta al estrés oxidativo.

Con respecto a *Tetrahymena thermophila*, en la bibliografía hemos encontramos un trabajo, bastante antiguo, en el que se describe el aislamiento y purificación de una proteína con actividad GST, con un peso molecular entre 33 y 35 KDa. (Overbaugh *et al.*, 1988). Más recientemente, se ha detectado la expresión de un gen potencialmente codificante de una glutatión transferasa en poblaciones expuestas a DDT (diclorodifeniltricloroetano) (Miao *et al.*, 2006),

deduciéndose que esta enzima desempeña un papel importante en la detoxificación de este insecticida. Por el contrario, este gen está reprimido en presencia de tributiltin (TBT) (Feng *et al.*, 2007).

3.1.4 Glutación peroxidasas (GPxs).

Las glutación peroxidasas (EC 1.11.1.9 y EC 1.11.1.12) son una superfamilia de enzimas que catalizan la reducción de H_2O_2 o hidroperóxidos orgánicos hasta agua o los alcoholes correspondientes, utilizando como donador de electrones el GSH (Figura 11), aunque existen evidencias recientes que sugieren que la mayoría de ellas, pueden utilizar también tiorredoxinas. Estas proteínas se encuentran representadas en la mayoría de los seres vivos y parecen tener un origen evolutivo muy antiguo (Margis *et al.*, 2008; Toppo *et al.*, 2008). Con excepción de las GPxs 5 y 6 de mamíferos, todas las glutación peroxidasas son selenoproteínas y contienen un residuo de SeCys en vez de Cys, formando parte de su centro activo. También se ha encontrado un residuo de SeCys en GPxs de nemátodos, artrópodos y el protista fotosintético *Chlamydomonas reinhardtii*. Sin embargo, las GPxs de bacterias, levaduras, plantas y protistas parásitos como *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum* (Herbette *et al.*, 2007) carecen de los residuos de selenocisteína. La principal función de las GPxs con SeCys es la protección celular frente a estrés oxidativo y en menor medida, son reservorios de selenio para otras selenoproteínas (Arthur, 2000). Por el contrario, las GPxs con Cys, no son buenas moléculas antioxidantes, más bien podrían actuar como sensores de ROS en varias rutas de transducción de señales, especialmente inducidas por la presencia de condiciones ambientales adversas (Herbette *et al.*, 2007).

3.1.5 Glutarredoxinas (Grxs).

En un principio fueron descritas como reductasas dependientes de glutación. Sin embargo, actualmente se consideran más próximas a las tiorredoxinas porque sus estructuras son muy similares, aunque las glutarredoxinas son, sin lugar a dudas, mucho más versátiles con respecto a sus sustratos y mecanismos de reacción. Además, a diferencia de las tiorredoxinas, pueden ser reducidas por glutación (Johansson *et al.*, 2004). Las glutarredoxinas son pequeñas proteínas (9-16 kDa) con actividad tiol-disulfuro óxidoreductasa, capaces de reducir una gran variedad de sustratos (Holmgren *et al.*, 2005). Están formadas por un dominio de tipo tiorredoxina (Martin, 1995) y su centro activo presenta un motivo, que es similar a todas las óxidoreductasas de la familia de las tiorredoxinas, con dos cisteínas en una secuencia común Cys-X-X-Cys ó Cys-X-X-Ser (Johansson *et al.*, 2004). Las glutarredoxinas pueden catalizar la reducción

Introducción

reversible de puentes disulfuro proteicos, al igual que las tioredoxinas. Además, son capaces de reducir las proteínas glutationiladas, es decir, proteínas unidas a glutatión (S-glutationilación o unión proteína-SSG). Esta reacción de deglutationilación tiene gran importancia y no puede ser catalizada por la tioredoxina (Holmgren and Aslund, 1995). La S-glutationilación proteica es un proceso reversible, considerado como una modificación postraducciona muy importante, que protege a los residuos proteicos de cisteína de la oxidación irreversible. Los procesos reversibles de glutatiónilación proteica juegan funciones muy relevantes como señales transductoras redox (Gallogly and Mieyal, 2007).

Una vez que las glutarredoxinas han reducido sus sustratos, se forma un puente disulfuro entre sus dos cisteínas que será reducido a su vez por GSH o por la enzima tioredoxina reductasa (Johansson *et al.*, 2004).

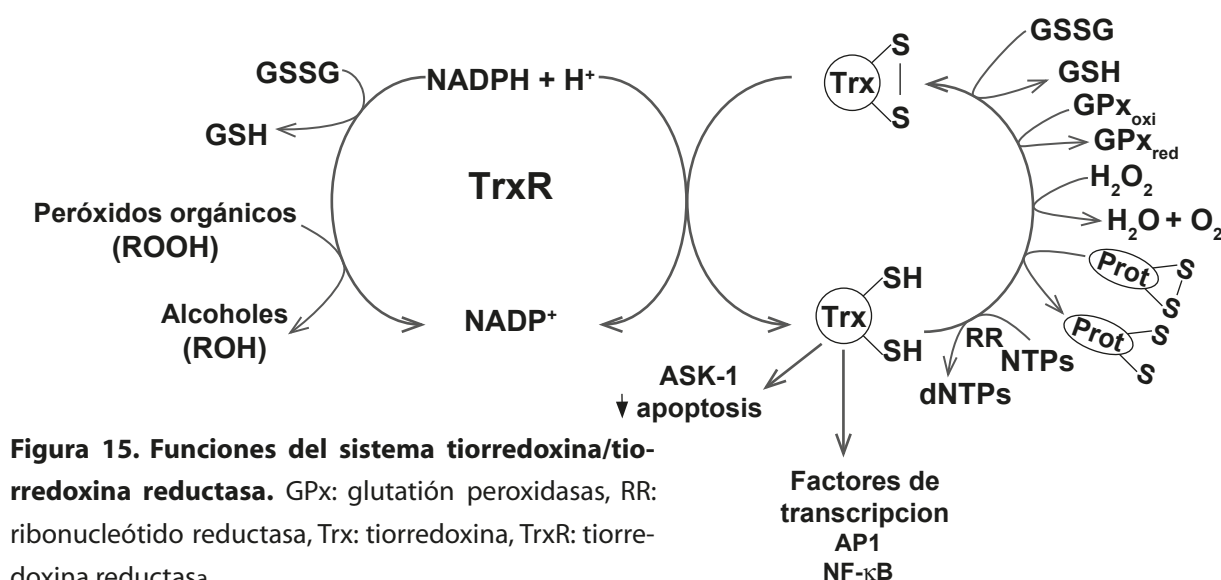
3.2 Sistema antioxidante dependiente de tioredoxina.

Es un sistema ubicuo que está compuesto por tioredoxina, la enzima tioredoxina reductasa y NADPH (que actúa específicamente como donador electrónico).

3.2.1 Tiorredoxina (Trx).

Las tioredoxinas son una familia de pequeñas proteínas (~12 KDa) con actividad redox, que están presentes en todos los organismos de la escala biológica, desde arqueas y bacterias hasta el hombre. La tioredoxina se describió por primera vez en la bacteria *Escherichia coli*, siendo considerada como un cofactor de la ribonucleótido reductasa (Figura 15), que es capaz de ceder el poder reductor para la síntesis de desoxirribonucleótidos (Laurent *et al.*, 1964). Independientemente de su origen, todas las tioredoxinas poseen en su centro activo la secuencia conservada Cys-Gly-Pro-Cys. Estos dos residuos de Cys son capaces de formar puentes disulfuro y de esta forma, ceder electrones y reducir una serie de sustratos (Arner and Holmgren, 2000) (Figura 15). La reacción es reversible, es decir, la Trx puede romper o formar disulfuros, dependiendo del potencial redox de su sustrato (Koharyova and Kolarova, 2008). Como todas las ditiol-disulfuro oxidoreductasas, todas las tioredoxinas catalizan la reducción de disulfuros a una velocidad muy superior a la del GSH (Nordberg and Arner, 2001). La gama de sustratos reducibles por tioredoxina es mucho más amplia en organismos superiores que en bacterias. En mamíferos, la tioredoxina es capaz de reducir directamente diversos compuestos como el disulfuro de glutatión, selenodiglutation, S-nitrosoglutation, vitamina K, selenito sódico, aloxan, peróxido de hidrógeno y otros muchos peróxidos, los puentes disulfuro de las proteínas, y ade-

más, regenera el centro activo de la glutatión peroxidasa (Arner and Holmgren, 2000; Nordberg and Arner, 2001; Koharyova and Kolarova, 2008) (Figura 15). Además, forman parte de otras muchas enzimas como son las glutarredoxinas, las GSTs, y las glutatión peroxidases (Ferrari and Soling, 1999).



En general, las funciones de las tiorredoxinas se pueden agrupar en dos grandes grupos: por un lado, actúan como cofactores de varias enzimas implicadas en rutas biosintéticas, principalmente de ADN, cediendo electrones, como por ejemplo, la ribonucleótido reductasa, metionina sulfóxido reductasa y sulfato reductasas. Por otro lado, como antioxidantes, impidiendo la inactivación o agregación proteica, al formar puentes disulfuro intra o intermoleculares (Arner and Holmgren, 2000). Además, las tiorredoxinas pueden desempeñar otras múltiples funciones celulares, mucho más específicas, dependiendo del sistema biológico considerado. En mamíferos, las tiorredoxinas reducidas son capaces de inhibir la apoptosis, uniéndose a ASK-1 (Kinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis) (Saitoh *et al.*, 1998). También pueden desplazarse al núcleo, donde están involucradas en la regulación redox, mediante su unión a ciertos factores de transcripción, favoreciendo o inhibiendo su unión al ADN. Así, por ejemplo, las tiorredoxinas pueden reducir un residuo de cisteína de los factores NF-κB, AP-1 y ARE, de forma que favorecen su unión al ADN (Matthews *et al.*, 1992a) (Figura 15). También, una variedad de procesos cancerígenos como el cáncer de colon, de pulmón o de hígado parecen estar asociados a una sobreexpresión de la tiorredoxina (Berggren *et al.*, 1996; Kawahara *et al.*, 1996). En plantas, las tiorredoxinas regulan la síntesis de las enzimas fotosintéticas de los cloroplastos. Finalmente, estas proteínas están implicadas en la asimilación de azufre en bacterias y levaduras, donan a la

Introducción

PAPS (3'-fosfoadenilsulfato) reductasa el hidrógeno necesario para que el sulfato se reduzca a sulfito (Arner and Holmgren, 2000).

La estructura 3D de las tiorredoxinas consiste en un núcleo central formado por 5 láminas β rodeado de 4 hélices α , en el orden lineal $\beta\alpha\beta\text{-}\alpha\beta\alpha\text{-}\beta\beta\alpha$. Al final de la segunda lámina β y el principio de la siguiente hélice α se localiza el centro activo, que presenta la secuencia aminoacídica típica Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys (Arner and Holmgren, 2000).

En procariotas se ha descrito una única Trx, como en protistas. Sin embargo, los mamíferos presentan dos Trxs distintas; Trx1 y Trx2. La Trx1 citosólica/nuclear es la Trx clásica con 12 kDa y aproximadamente, 104 aminoácidos. La Trx2 o mitocondrial tiene en el extremo N-terminal una prolongación de 60 aminoácidos, que representa la señal de translocación a la mitocondria. Esta isoforma juega un papel crucial en la regulación de la vía mitocondrial de la apoptosis (Nordberg and Arner, 2001). El caso extremo ocurre en plantas, como ejemplo *Arabidopsis thaliana*, donde se han identificado 20 isoformas distintas, distribuidas entre citosol, mitocondrias y cloroplastos (Rouhier *et al.*, 2008).

La expresión de los genes codificantes de tiorredoxinas es inducida por estrés oxidativo e implica, entre otros factores, al elemento ARE (*Antioxidant Responsive Element*) presente en el promotor de Trxs. Por lo tanto, las Trxs son inducidas por múltiples estímulos, entre los que destacamos; ciertos herbicidas e insecticidas, hipoxia, H_2O_2 y otros agentes oxidantes, infecciones tanto virales como bacterianas, radiación ultravioleta y radiaciones ionizantes. La expresión de las Trxs depende también de la fase del ciclo celular (Powis and Montfort, 2001).

3.2.2 Tiorredoxina reductasa (TrxR).

La tiorredoxin reductasa (TrxR) (EC1.6.4.5) es la enzima capaz de regenerar la tiorredoxina a su estado reducido, a expensas de poder reductor cedido por el NADPH (Figura 15). Esta enzima, como la glutatión reductasa y tripanotión reductasa, pertenece a la familia de flavoproteínas de pirimidina-disulfuro nucleótido oxidorreductasas. Los miembros de esta familia son proteínas homodiméricas, que incluyen en cada monómero un sitio de reconocimiento del grupo prostético FAD, un sitio de unión del NADPH y un centro activo con actividad redox formado por dos residuos de Cys (Williams *et al.*, 2000). En este caso, al contrario de lo que ocurre con las Trxs, las TrxRs no están muy conservadas a lo largo de la evolución, sino que existen dos tipos con un tamaño y características distintos. Un primer tipo, denominado de alto peso molecular (H-TrxRs) (~ 55 kDa), es una proteína que se encuentra en el protozoo parásito *Plasmodium falciparum* y en animales, desde el *Homo sapiens* a *Caenorhabditis elegans*. El segundo

tipo, denominado de bajo peso molecular (L-TrxRs) (~ 35 kDa), no contiene selenio y está presente en bacterias, arqueas, plantas, hongos, protozoos parásitos como *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*. Ambos tipos son excluyentes, es decir, hasta ahora, no se han localizado los dos tipos simultáneamente (H-TrxR y L-TrxR) en el genoma de ningún organismo (Hirt *et al.*, 2002). Los protozoos tripanosomátidos poseen tiorredoxina, proteína que no parece ser necesaria para completar su ciclo biológico, pero todavía no se ha identificado TrxR en ninguno de estos microorganismos (Muller, 2004).

Las TrxRs de alto peso molecular (H-TrxRs) están relacionadas con las glutatión reductasas, tripanotión reductasas, mercurio reductasas y lipoamida deshidrogenadas. Sin embargo, las TrxRs de bajo peso molecular (L-Trxs), son más similares a la alquil hidroperóxido reductasa. Además, sus mecanismos catalíticos son claramente diferentes (Koharyova and Kolarova, 2008). Por estas razones, junto con el bajo grado de similitud entre ellas (20% de identidad de secuencias), H-TrxR y L-TrxR son proteínas consideradas homólogas como consecuencia de un proceso de convergencia evolutiva (Hirt *et al.*, 2002).

3.2.2.1 Tiorredoxinas reductasas de alto peso molecular (H-TrxRs).

La primera H-TrxR caracterizada se aisló de hígado de ternera (Holmgren, 1977). En cada monómero de estas enzimas podemos distinguir tres dominios; el dominio de reconocimiento al FAD, el dominio de unión al NADPH y el dominio de reconocimiento de los distintos sustratos. El sitio activo redox, localizado en el dominio FAD, se caracteriza por la secuencia altamente conservada Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys. En 1996, Stadtman y colaboradores (Tamura and Stadtman, 1996), trabajando con células humanas de adenocarcinoma de pulmón, localizaron un residuo de selenocisteína hacia el extremo C-terminal de la proteína, dentro de una secuencia altamente conservada (Gly-Cys-SeCys-Gly). Este residuo forma parte de un segundo sitio activo redox, y está presente en casi todos los animales estudiados, incluyendo especies parásitas como *Schistosoma mansoni*. Sin embargo, está ausente en *Drosophila*, donde el residuo de SeCys ha sido substituido por un residuo de Cys, y por tanto, tiene el dominio Gly-Cys-Cys-Gly (Kanzok *et al.*, 2001). La TrxR de *Plasmodium* carece también del residuo de SeCys, y posee también, el segundo sitio activo redox, característico de animales, conformado por dos Cys terminales (Muller *et al.*, 1996) (Figura 12). La presencia de este segundo sitio activo incrementa notablemente la gama de sustratos reducibles. Las H-TrxRs no sólo reducen los puentes disulfuro de la tiorredoxina oxidada, sino que son capaces de reducir un amplio espectro de puentes disulfuro presentes en diferentes proteínas y compuestos tiólicos de baja masa molecular como el GSH. Incluso son capaces de reducir compuestos no tiólicos, como los peróxidos, tanto orgánicos

Introducción

como inorgánicos (Bjornstedt *et al.*, 1995). En *Drosophila melanogaster*, organismo que carece de glutatión reductasa, la TrxR es la enzima encargada de regenerar el GSSG a GSH (Kanzok *et al.*, 2001).

Estudios genómicos recientes a gran escala parecen señalar que las H-TrxRs habrían evolucionado a partir de la glutatión reductasa en una fase muy preliminar (pre-animal) del desarrollo celular eucariota, mediante la adición al carboxilo terminal de la glutatión reductasa, de un motivo con actividad redox dependiente de selenocisteína. Este proceso evolutivo habría transcurrido en paralelo con la presencia de L-TrxR en el mismo organismo. Posteriormente, la enzima de tamaño más pequeño se habría perdido en el curso de la evolución, lo mismo que el sitio activo dependiente de SeCys, que habría sido sustituido por un sitio activo ditiólico, dependiente de Cys, en algunos organismos eucariotas superiores (Kryukov *et al.*, 2003; Arner, 2009).

En mamíferos existe una TrxR citosólica/nuclear (TrxR1) y dos isoformas adicionales, una predominantemente mitocondrial (TrxR2) y otra localizada en testículo (TGR). Esta última selenoproteína tiene un alto porcentaje de similitud con las H-TrxRs, pero además contiene, en el extremo N-terminal, una extensión homóloga con las glutarredoxinas. Esta enzima es capaz de reducir los puentes disulfuro de una gran variedad de sustratos entre los que se encuentran las Trxs, GSSG, y las glutarredoxinas, por lo que se le ha denominado, tiorredoxina glutatión reductasa (TGR) (Sun *et al.*, 2001). Está presente también en nemátodos (Alger and Williams, 2002).

La selenocisteína (SeCys) se diferencia del aminoácido de cisteína en que el átomo de azufre es sustituido por un átomo de selenio. El selenio tiene propiedades químicas semejantes al azufre, pero su bajo pKa (5,3) y su fuerte carácter nucleófilo confieren mayor reactividad a la SeCys respecto a la Cys (Lu and Holmgren, 2009). La incorporación de la SeCys por la maquinaria traduccional ocurre a través de un mecanismo único; el ARNt-Ser es enzimáticamente "selenilado" convirtiéndolo en selenocisteinil-ARNt, que reconoce el codon UGA, que normalmente es el codon "stop". La "decisión" de "leer" UGA como codon "stop" o el de la SeCys depende de la presencia de una secuencia específica (SECIS) en la región 3'UTR del ARNm, que adquiere una estructura secundaria en forma de lazo. Además, en humanos, se han localizado en la región 3'UTR motivos ARE, que estarían regulando la respuesta de esta enzima a estrés (Mustacich and Powis, 2000).

Se denomina selenoproteínas al grupo de proteínas que contienen SeCys como parte integral de su cadena polipeptídica. Las selenoproteínas están presentes en los tres dominios de seres vivos (Bacteria, Archaea, Eukarya) y se distribuyen en 30 familias distintas. Estas proteí-

nas desempeñan importantes funciones celulares y algunas están asociadas a procesos patológicos de mamíferos (Papp *et al.*, 2007). Entre estas selenoproteínas, las glutatión peroxidadas, tiorredoxina reductasas y probablemente, la denominada selenoproteína P (SeP) proporcionan protección como antioxidantes, frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Steinbrenner and Sies, 2009).

3.2.2.2 Tiorredoxina reductasas de bajo peso molecular (L-TrxRs).

Las TrxRs presentes en bacterias, hongos, plantas y ciertos protistas microaerófilos son también homodímeros, pero con monómeros más pequeños (35 kDa aproximadamente). La conformación de los dominios es también diferente. Estas enzimas poseen únicamente un centro activo con el dominio Cys-X-X-Cys, donde X representa cualquier aminoácido excepto Cys. A diferencia de las H-TrxRs, el centro activo no se encuentra en el interior del dominio FAD, sino en el dominio NADPH (Hirt *et al.*, 2002). Al contrario que las H-TrxRs, que son capaces de reducir múltiples sustratos, las L-TrxRs son altamente específicas para la Trx e incapaces de utilizar otras moléculas como sustratos (Gasdaska *et al.*, 1999). En la Figura 12 se ha representado de forma comparativa la estructura de los dominios de estas oxidorreductasas.

3.3 Sistema antioxidante dependiente de tripanotión.

3.3.1 Tripanotión ($T[SH]_2$).

El tripanotión (N1,N8-bis(glutationil)espermidina) es un tiol de bajo peso molecular, que está constituido por dos moléculas de glutatión unidas por un enlace covalente a una poliamina, la espermidina (Figura 16). Este antioxidante fue descubierto en 1985, al estudiar el control redox en tripanosomátidos, grupo de protozoos parásitos de animales vertebrados e invertebrados (Fairlamb *et al.*, 1985). Estos microorganismos carecen del sistema GSH/GR, de manera que sus funciones son llevadas a cabo por su derivado, el tripanotión y la enzima que lo reduce, la tripanotión reductasa. Aunque el potencial redox de ambos tioles es muy similar, el tripanotión es un compuesto más reactivo que el glutatión por dos motivos principales: en primer lugar, el pKa de su cisteína (7,4) es más semejante al pH fisiológico que el del glutatión. En segundo lugar, su naturaleza de ditiol favorece la formación de puentes disulfuro dentro de la

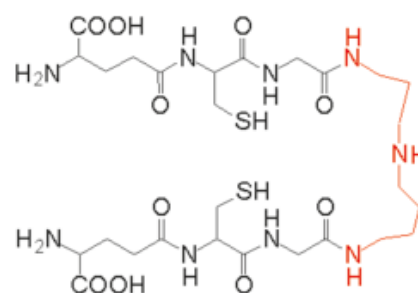


Figura 16. Estructura de tripanotión.

En color rojo aparece la molécula de espermidina y en negro las dos moléculas de glutatión.

Introducción

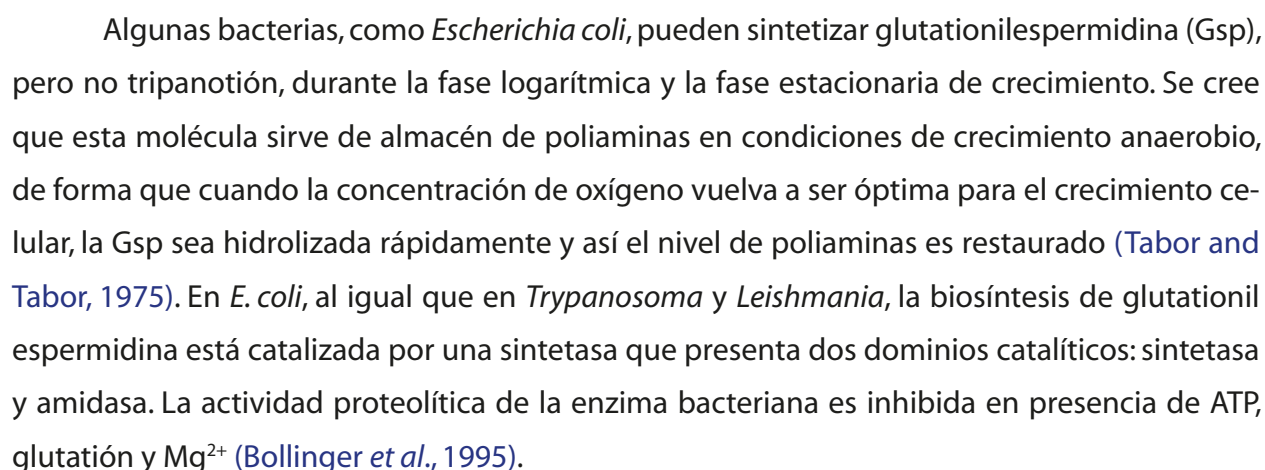
misma molécula (Irigoien *et al.*, 2008). Por lo tanto, el tripanotión reducido ($T[SH]_2$) actúa de forma similar al GSH, manteniendo la homeostasis redox intracelular, como donador de electrones en una gran variedad de reacciones biológicas. Esta molécula es capaz de reducir directamente peróxidos, tanto orgánicos como inorgánicos, los puentes disulfuro de las proteínas e incluso glutatión oxidado. Como ocurre con el GSH o la Trx, el tripanotión es también importante en la síntesis del ADN, proporcionando los equivalentes de poder reductor a la ribonucleótido reductasa. Cuando se alcanzan concentraciones elevadas, el $T[SH]_2$ reacciona directamente con la ribonucleótido reductasa, siendo el único tiol conocido de bajo peso molecular capaz de llevar a cabo esta reacción (Dormeyer *et al.*, 2001). En el sistema del glutatión, esta función está asignada a las glutarredoxinas. Por tanto, interviene en muchos procesos celulares relevantes, como la protección del ADN frente a los potenciales daños generados por las radiaciones, neutralización de peróxidos, resistencia a agentes antiparasitarios y detoxificación del metilglioxal (Krauth-Siegel *et al.* 2007). El $T[SH]_2$ reacciona con una gran variedad de compuestos electrófilos como metales pesados y muy diversos compuestos xenobióticos (Krauth-Siegel *et al.*, 2005).

Desde su descubrimiento, se consideró que el tripanotión era un antioxidante exclusivo de tripanosomátidos, microorganismos que presentan un metabolismo tiólico singular. Hasta el presente, se ha encontrado el sistema del tripanotión en diversas especies de los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* (Krauth-Siegel *et al.*, 2007; Peacock, 2007; Krauth-Siegel and Comini, 2008), y en *Crithidia fasciculata* (Comini *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que la mayoría de tripanosomátidos son parásitos obligados y esta molécula es imprescindible para la virulencia, se postulaba que el sistema tripanotión era una adaptación específica al modo de vida parasitario. Sin embargo, posteriormente se ha demostrado la coexistencia de los sistemas GSH/GR y $T[SH]_2/TR$ en *Euglena gracilis*, un flagelado fotosintético de vida libre, que está evolutivamente bastante distante de los tripanosomátidos (Montrichard *et al.*, 1999). Recientemente, se ha detectado la presencia de tripanotión en *Naegleria fowleri*, protista carente de mitocondrias, que comparte también ambos sistemas antioxidantes, uno dependiente GSH y el otro de $T[SH]_2$ (Ondarza *et al.*, 2006). Esta pequeña ameba de vida libre, puede ser patógena para el hombre, produciendo una infección grave conocida como meningoencefalitis primaria aguda, que suele ser mortal.

3.3.2 Biosíntesis de tripanotión.

El proceso de síntesis de tripanotión presenta distintos mecanismos en función del organismo considerado. En general, esta molécula es sintetizada en dos etapas consecutivas, ambas dependientes de ATP. En cada una de estas etapas se adiciona una molécula de glutatión a

Figura 17. Biosíntesis de tripanotión. GspS: glutationilespermidina sintetasa. TryS: tripanotión sintetasa. La TryS es capaz de unir dos moléculas de GSH a la espermidina, mientras que la GspS sólo puede ligar una.



Introducción

Hasta el momento, sólo se han estudiado y caracterizado las enzimas TryS y GspS de tripanosomátidos y bacterias, pero no existe información detallada sobre estas proteínas o los genes que las codifican en otros microorganismos como *Euglena* o *Naegleria*. En todos los casos estudiados, estas enzimas tienen dos dominios, el dominio N-terminal con actividad amidasa y el dominio C-terminal con actividad sintetasa. Esto significa que la enzima contiene funciones antagónicas, la actividad sintetasa da como producto el tripanotión, y la actividad amidasa hidroliza el tripanotión en sus dos componentes: glutatión y espermidina. Mediante experimentos de clonación de una copia del gen de TryS de *Trypanosoma cruzi* y expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*, se ha comprobado que la enzima es capaz de sintetizar tanto glutatiónespermidina como tripanotión, lo cual indica que puede catalizar ambas etapas de la ruta biosintética del tripanotión. La enzima recombinante presenta una inhibición notable por glutatión y su actividad amidasa es muy débil (Oza *et al.*, 2003). Estos estudios indican además, que si ambos dominios se aíslan, son capaces de llevar a cabo sus correspondientes actividades de forma independiente (Oza *et al.*, 2002).

La formación de tripanotión es esencial para la supervivencia de los tripanosomátidos. Así, en *T. brucei* se ha comprobado que la inhibición de la expresión génica de la TryS, mediante ARN de interferencia, provoca la muerte del microorganismo (Ariyanayagam *et al.*, 2005).

3.3.3 Tripanotión reductasa (TR).

De manera similar al glutatión y la tiorredoxina, la forma oxidada del tripanotión es reciclada a la forma reducida activa por la enzima tripanotión reductasa (EC1.8.1.12) (TryR). Como las enzimas GR y TrxR, la TryR es una flavoenzima nucleótido de pirimidina disulfuro óxidoreductasa. Ambas enzimas, tripanotión reductasa (TryR) y glutatión reductasa (GR) comparten un elevado porcentaje de similitud. La principal diferencia radica en su grado de especificidad; la TryR reacciona con formas oxidadas de conjugados de glutatión y espermidina cargadas positivamente, mientras que la GR interacciona con GSSG, que está cargado negativamente (Jockers-Scherubl *et al.*, 1989; Stoll *et al.*, 1997).

En conclusión, el metabolismo redox de tripanosomátidos es extremadamente complejo y muy distinto del que presentan otros protistas eucariotas y los organismos superiores. Recientemente, se han descrito nuevas actividades del sistema tripanotión, molécula importante en los procesos de detoxificación en tripanosomátidos. Entre ellas, cabe destacar, la actividad tripanotión transferasa, que interviene en reacciones de conjugación del tripanotión, lo que facilitaría su función como detoxificante de agentes contaminantes. Esta enzima juega un

papel esencial en la protección frente a la peroxidación lipídica (Vickers and Fairlamb, 2004). Otra actividad importante, dependiente de tripanotión, son las triparredoxinas (Tprx): oxidorreductasas multifuncionales, relacionadas remotamente con la familia de las tiorredoxinas, que tienen características funcionales similares a glutarredoxinas y tiorredoxinas (Krauth-Siegel *et al.*, 2007; Krauth-Siegel and Comini, 2008). Hay que señalar que los tripanosomátidos carecen en sus genomas de genes codificantes de catalasas, glutatión reductasas y tiorredoxina reductasas, aunque poseen tiorredoxinas y glutarredoxinas. Otras enzimas muy importantes en el metabolismo tiólico de tripanosomátidos son las peroxidasas. Estos microorganismos eucariotas poseen dos clases de enzimas detoxificantes de hidroperóxidos: peroxirredoxinas (Prxs) y triparredoxina peroxidasas (TPrxs). Estas proteínas son muy distintas a las selenoenzimas de mamíferos y otros organismos (Krauth-Siegel and Comini, 2008).

Introducción

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Resumen de resultados

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

Objetivos

En el presente trabajo se desea alcanzar los siguientes objetivos: :

- 1- Conocer la importancia del glutatión en la respuesta frente al estrés oxidativo inducida por metales y otros agentes en el ciliado-modelo *Tetrahymena thermophila*.
- 2- Evaluar los requerimientos de enzimas antioxidantes (relacionadas o no con el metabolismo del glutatión) frente a ese mismo estrés.
- 3- Llevar a cabo un análisis comparativo "*in silico*" de las enzimas seleccionadas.
- 4- Dilucidar la presencia de diferentes patrones de respuesta en función del agente productor del estrés.
- 5- Proponer un posible escenario, tras integrar los datos obtenidos, del comportamiento celular frente al estrés originado por los metal(oid)es.

Introducción

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Resumen de resultados

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

Introducción

Objetivos

**Materiales y
Métodos**

Resultados

Discusión

Resumen de
resultados

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

Materiales y Métodos

MATERIALES

1 MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO.

1.1 Microorganismo eucariota.

Este estudio se ha desarrollado con la cepa SB1969 del protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* (Eukaryota; Alveolata; Ciliophora; Intramacronucleata; Oligohymenophorea; Hymenostomatia; Tetrahymenina; Tetrahymenidae; *Tetrahymena*), que nos fue amablemente cedida por el Dr. Eduardo Orias (*University of California, Santa Bárbara, EEUU*). El genotipo de esta cepa es: *Pmr/Pmr*, *Pm-S 2dgal-R II*, es decir, su micronúcleo es paramomicina (*Pmr*) resistente, su macronúcleo paramomicina sensible y 2d-galactosidasa resistente y presenta un tipo conjugante II.

Este protozoo ciliado ha sido cultivado a 32 °C en medio PP210.

Los inóculos de partida que se utilizaron, se encontraban en fase estacionaria (10^6 células/ml) y se diluyeron hasta alcanzar una concentración de 5×10^3 células/ml. Los tratamientos a los que se sometieron estos cultivos, se llevaron a cabo a las 18-20 horas de crecimiento, que se corresponde con la fase exponencial tardía ($1-3 \times 10^5$ células/ml).

1.2 Microorganismo procariota: estirpe bacteriana utilizada para la clonación.

La estirpe bacteriana *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen), F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcr-BC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*, fue utilizada para la clonación de fragmentos obtenidos por PCR. Se utilizó el vector pCR®2.1-TOPO correspondiente al kit comercial TOPO TA Cloning (Invitrogen). Esta cepa no expresa el represor lac, por lo que no es necesaria la presencia de IPTG (isopropanil- β -D-tiogalactósido).

Permite, mediante la adquisición de resistencia a la kanamicina, identificar las células que han sido transformadas con el vector. Además es posible diferenciar entre colonias recombinantes (colonias blancas) y las no recombinantes (colonias azules) cuando crecen en presencia de 5-bromo-4cloro-3indolil-β-D-galactósido (X-gal).

2 MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento y mantenimiento de los distintos microorganismos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 2.

Medios de cultivo	Composición	Aplicación
Luria Bertani (LB) (Pronadisa)	Triptona 10 g/l Extracto de levadura 5 g/l NaCl 5 g/l Agar bacteriológico 15 g/l (para LB agar)	Cultivo de <i>E. coli</i>
SOC (Invitrogen)	Triptona 2% Extracto de levadura 0,5% NaCl 10 mM KCl 2,5 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 10 mM Glucosa 20 mM	Cultivo de <i>E. coli</i> TOPO 10 inmediatamente después de la transformación
PP210	Proteosa peptona 2% (Difco) suplementado con: FeCl ₃ 10 μM (Sigma) Estreptomicina/Penicilina G 250 μg/ml (Sigma)	Cultivo de <i>T. thermophila</i>

Tabla 2. Medios de cultivo empleados para el crecimiento de los microorganismos utilizados en este trabajo.

3 SOLUCIONES Y TAMPONES.

La composición y la utilidad de los diferentes tampones y soluciones empleados en este trabajo se detallan en las Tablas 3 y 4 respectivamente.

Tampón	Composición	Aplicación
Tampón de carga 5x para electroforesis de ADN	Glicerol 20% Panreac EDTA 4 mM pH 8 (BM) Azul de bromofenol 2,5% (BioRad)	Tampón de carga de muestras de ADN
Tampón de carga 5x para electroforesis de ARN	Glicerol 20% Panreac EDTA 4 mM pH 8 (BM) Azul de bromofenol 2,5% (BioRad) Formaldehído 9 M (Merck) Formamida 30% (Merck) Tampón FA 2x	Tampón de carga de muestras de ARN
Tampón de DNasa 10x (Ambion)	Tampón Tris 100 mM MgCl ₂ 25 mM CaCl ₂ 1 mM	Incubación enzima DNasa
Tampón EB (Qiagen)	Tris-HCl 10 mM pH 8,5	Elución de ARN purificado en columnas de fibra de vidrio
Tampón FA 10x	MOPS 200 M (Roche) Acetato sódico 50 mM (Panreac) EDTA 10 mM (BM) Ajustado a pH 7 con NaOH	Tampón de electroforesis de ARN en condiciones desnaturizantes
Tampón fosfato 100 mM pH 7	61,5ml K ₂ HPO ₄ 1 M (Sigma) 38,5ml KH ₂ PO ₄ 1 M (Sigma) 2-β-mercaptoetanol 7mM (Sigma) EDTA 2,7 mM (BM) Hasta 1 l de agua destilada	Tampón de lisis celular para la preparación de extractos celulares
Tampón H 10x (Takara)	Tampón Tris-HCl 0,5M pH 7,5 MgCl ₂ 100 mM DTT 10 mM NaCl 500 mM	Digestión de ADN con la endonucleasa EcoRI
Tampón Hepes 50 mM pH 7	Hepes 50 mM (Sigma) EDTA 1 mM (BM) Ajustado a pH 7 con NaOH	Determinación de la actividad oxidoreductasa de las enzimas GR y TryR
Tampón Hepps 40 mM pH 8	Hepss 40 mM (Sigma) DPTA 4 mM (Sigma) Ajustado a pH 8 con LiOH	Tampón de lisis celular para análisis por HPLC
Tampón NDS 1x	Tris HCl 10 mM pH 8 (Amresco) EDTA 0,5 mM (BM) SDS 1% (Panreac)	Tampón de lisis celular para el aislamiento de ADN genómico de <i>Tetrahymena</i>
Tampón RTL 1x (Qiagen)	Composición desconocida	Tampón de lisis celular para aislamiento de ARN total
Tampón TAE 50x (National Diagnostics)	Tris Acetato 2 M Na ₂ EDTA 100 mM	Tampón de electroforesis en geles de agarosa
Tampón TE	Tris 10 mM (Amresco) EDTA 1 mM pH 7,5 (BM)	Resuspender ADN
Tampón Tris-HCl 10 mM pH 6,8	Tris base 10 mM (Amresco) Ajustado a pH 6,8 con HCl	Lavado de células y tratamiento de inanición

Tabla 3. Tampones utilizados.

Solución	Composición	Aplicación
5-bromo-4cloro-3indolil- β -D-galactósido (X-Gal)	X-Gal 40 mg/ml (Sigma) DMF 100%	Selección de clones transformados
Agua libre de RNasas	DEPC 0,1% (Sigma) Se incuba 12 h a 37 °C y posterior inactivación en autoclave.	Preparación de tampones y soluciones destinadas al trabajo con ARN
Reactivo de Bradford	Azul Coomasie G-250 0,05% (BioRad) Ácido fosfórico 42,5%(Panreac)	Método Bradford
Reactivo de Ellman (DTNB)	DTNB 0,3 mg/ml (Sigma) DMSO 20% (Merck) Tampón fosfato	Cuantificación enzimática de GSH
Solución de monobromo-bimano (mBrB)	mBrB 2 mM (Molecular Probes) Etanol 100% (Sigma)	Marcaje de grupos tiólicos para la detección por HPLC
Solución de diacetato de 5-clorometilfluoresceína (CMFDA)	CMFDA 20 μ M (Molecular Probes) Tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5	Cuantificación de grupos tiólicos por citometría de flujo
Solución de yoduro de propicio (IP)	IP 0,5 mg/ml (Molecular Probes) Tampón Tris-HCl 10 mM pH 6,8	Cuantificación de mortalidad celular por citometría de flujo
Solvente A	Ácido campforsulfónico 0,25% (Sigma) pH 2,5 ajustado con LiOH sólido	Formación del gradiente para HPLC
Solvente B	Ácido campforsulfónico 0,25% (Sigma) Propanol 25% (Merck) Ajustado pH 2,5 con LiOH sólido	Formación del gradiente para HPLC

Tabla 4. Otras soluciones utilizadas.

4 TRATAMIENTOS.

Para los estudios realizados en este trabajo, la cepa *Tetrahymena thermophila* SB1969 fue sometida a diferentes tratamientos, como se refleja en la Tabla 5. Las concentraciones, tiempos de incubación y condiciones de exposición se especificarán en cada apartado.

Tratamiento	Agente	Mecanismo de acción
Metal pesado	Cd^{2+} , Cu^{2+} , As^{5+} , Zn^{2+} y Pb^{2+}	Muy diverso
Estrés oxidativo	Paraquat (PQ)	Producción de $\text{O}_2^{\cdot -}$ y $\text{OH}^{\cdot -}$
	Menadiona (MD)	Producción de $\text{O}_2^{\cdot -}$
	1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB)	Producción de $\text{O}_2^{\cdot -}$ e inactivación de defensas antioxidantes
Inhibidores de GSH	Butionin sulfoximina (BSO)	Inhibe la biosíntesis de GSH
	N-etilmaleimida (NEM)	Bloquea los grupos tiólicos

Tabla 5. Condiciones de estrés a las que fue sometida *Tetrahymena thermophila*.

MÉTODOS

5 ESTUDIO DEL CONTENIDO TIÓLICO EN *Tetrahymena thermophila*.

5.1 Determinación de GSH por citometría de flujo.

Para determinar por fluorescencia la cantidad de GSH, utilizamos un fluorocromo de nueva generación, el CellTraker Green CMFDA (diacetato de 5-clorometilfluoresceína). Molecular Probes comercializa este fluorocromo como específico de GSH, ya que se une al GSH a través de la acción de la GST formando un conjugado que es hidrolizado por esterasas para dar un producto fluorescente.

Para analizar los niveles de GSH exclusivamente en la población de células vivas, se incorporó el fluorocromo yoduro de propidio (IP), también de Molecular Probes. Las células vivas son capaces de expulsar este colorante, pero no así las células muertas que fluorescen en rojo. Este doble marcaje permite determinar la fluorescencia en verde, debida al GSH, en células vivas y el porcentaje de mortalidad de cada población.

En la Figura 18 se muestran los espectros de absorción/emisión de los fluorocromos empleados en este estudio.

En el citómetro de flujo FACScalibur se analizó la fluorescencia de aproximadamente 10^4 células para cada tratamiento. Los productos fluorescentes se excitaron con un láser de argón de 488 nm y la fluorescencia emitida se recogió en FL-1 (530/30 nm, verde) para el CMFDA y en FL-2 (585/42 nm, rojo) para el IP (Figura 18).

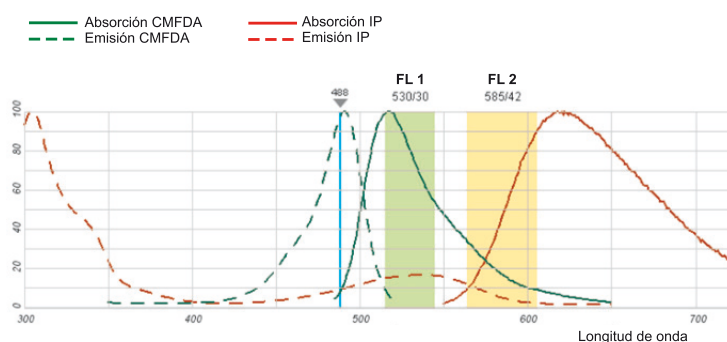


Figura 18. Espectros de absorción y emisión de los fluorocromos utilizados en la determinación del contenido en GSH por citometría de flujo. La línea continua representa los espectros de emisión y la discontinua los espectros de absorción. En color verde se muestran los espectros del CMFDA y en rojo los del IP. La línea vertical en color azul (en la longitud de onda de 488 nm) hace referencia a la excitación de los fluorocromos, mientras que las regiones en color verde y naranja hacen referencia a la longitud de onda en la que se recogió la fluorescencia para el CMFDA y el IP respectivamente.

Se cuantificaron los grupos tiólicos de cultivos de *T. thermophila* sometidos a diferentes tratamientos tales como; metales pesados (Cd^{2+} y As^{5+}) y agentes oxidantes (paraquat y menadiona). Además se utilizó un bloqueador de grupos tiólicos; la N-etilmaleimida (NEM) y un inhibidor de la síntesis *de novo* del GSH; la butionin sulfoximina (BSO).

Preparación de las soluciones de tratamiento:

Todas las soluciones destinadas a los diferentes tratamientos, se prepararon 10 veces más concentradas, de esta forma al añadirlas a los cultivos celulares, se realizaba una dilución 1/10, obteniéndose así la concentración final deseada.

Soluciones de metales (Sigma).

A partir de sales metálicas se prepararon las soluciones 10x de las diferentes concentraciones en el tampón Tris-HCl (ver Tabla 6 donde aparecen las concentraciones finales).

Solución de Paraquat (PQ) (Sigma).

De forma análoga a las soluciones metálicas se prepararon, en tampón Tris-HCl, las soluciones de PQ a las diferentes concentraciones (Tabla 6).

Solución de menadiona (MD) (Sigma).

Se realizó una solución 5 M de MD en cloroformo a partir del cual se obtuvieron las diferentes soluciones de tratamiento (Tabla 6).

BSO (butionin sulfoximina).

Se elaboró una solución 1 mM de BSO (Sigma) directamente en tampón Tris-HCl.

NEM (N-etilmaleimida).

Se preparó una solución 50 mM NEM (Sigma) en etanol. Posteriormente se procedió a diluir hasta 0,5 mM (dilución 1/100) en Tris-HCl.

Agente	Compuesto	Concentraciones	Medio	Tiempo de exposición
Metales pesados:				
Cadmio (Cd^{2+})	CdCl_2	1,32/1,54/1,76 μM	Tris-HCl	2-24 horas
Arsénico (As^{5+})	$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	33/66/133 μM	Tris-HCl	2-24 horas
Oxidantes:				
Paraquat (PQ)	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2$	2,5/5/10 mM	Tris-HCl	24 horas
Menadiona(MD)	$\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_2$	5/7,5/10 mM	Tris-HCl	2 horas

Tabla 6. Tratamientos utilizados en el estudio del contenido de GSH.

Preparación de las muestras para citometría.

Para las muestras tratadas con BSO se recogieron 100 ml de cultivo de *T. thermophila*, en fase exponencial tardía, por centrifugación a 500 xg durante 3 min. Se lavaron dos veces en tampón Tris-HCl y se resuspendieron en este mismo tampón hasta alcanzar la concentración de $1-3 \times 10^5$ células/ml. La mitad de las células se reservaron como población control y el resto fue tratado con 100 μM de BSO durante 20 horas a 32 °C con el fin de inhibir la biosíntesis de GSH. Tras el tiempo de incubación se procedió a incorporar el segundo agente de tratamiento, en este caso los metales pesados o los agentes oxidantes a las diferentes concentraciones. Se cuantificaron los grupos tiólicos de estas muestras a las 2 y las 24 h (Figura 19A).

En el caso de los tratamientos con NEM, las células se recogieron de forma similar al caso anterior. Los cultivos así obtenidos, se dividieron en 2 series de tubos. Ambas series fueron sometidas a una concentración creciente de metal pesado o agente oxidante. Como en el caso anterior, las muestras se llevaron al citómetro a las 2 y 24 h de exposición. Y 30 minutos antes de la valoración, se procedió a bloquear los grupos tiólicos en una de las series con 50 μM NEM y diez minutos después (20 minutos antes de la lectura) se marcaron los grupos tiólicos con el fluorocromo CMFDA (Figura 19B).

En todos los casos, para el marcaje con CMFDA, se dispensaron 600 μl de cada muestra en tubos de citometría y se añadieron 30 μl de la solución 20 μM de CMFDA y 6 μl de la solución 5 $\mu\text{g/ml}$ IP con el fin de cuantificar también la mortalidad celular.

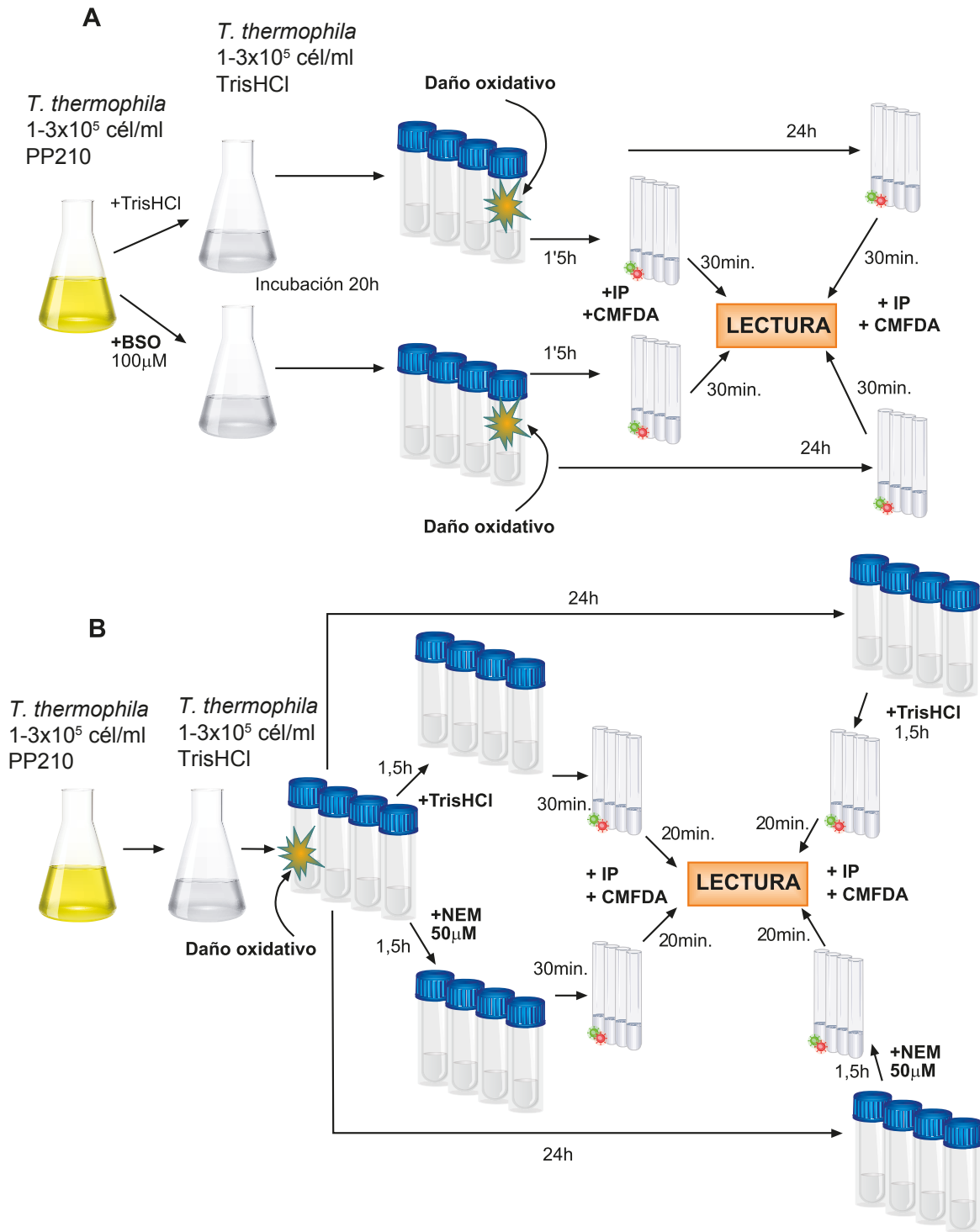


Figura 19. Protocolo de actuación para la preparación de las muestras de citometría. En la parte superior, la figura A muestra los pasos llevados a cabo en el caso del BSO y en la inferior, la figura B, el caso de NEM.

Análisis de datos.

Los valores de fluorescencia se normalizaron respecto al control de cada experimento.

Para el análisis estadístico de los datos se realizó una prueba de medidas repetidas, en el caso que no hubiera interacción entre los dos factores a analizar, el inductor de estrés oxidativo (metales, oxidantes o variaciones de pH) y el inhibidor de grupos tiólicos (BSO o NEM). En los casos en los que la interacción fue significativa, para analizar el efecto del inhibidor de grupos tiólicos, se realizó una prueba t-student para cada nivel del inductor de estrés. Y para analizar el efecto del inductor de estrés, se realizó un test de medidas repetidas, pero en este caso, de forma separada para cada nivel del inhibidor.

Se consideró efecto significativo cuando el valor de $p \leq 0,005$. Todos estos análisis se elaboraron con el programa informático SPSS v.15.0.

5.2 Determinación enzimática de GSH.

Obtención de los extractos celulares.

Se realizaron estudios previos para determinar si la concentración de GSH era directamente proporcional al número de células analizadas. Se obtuvieron extractos a partir de poblaciones celulares con de 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 y 10^8 células. Todas las medidas fueron lineales y se eligió la cantidad de 10^6 células para los futuros análisis.

Para preparar los extractos de las poblaciones sometidas a los mismos tratamientos que en el caso anterior, se recogieron 10^6 células por centrifugación ($500 \times g$) a 4°C durante 3 minutos, y se lavaron dos veces con tampón Tris-HCl. Al sedimento de la centrifugación se le añadieron $160 \mu\text{l}$ de 10 mM HCl 4 mM EDTA, y se procedió a la lisis celular, mediante dos ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación en un baño a 37°C . Una vez lisadas las células, se adicionaron $40 \mu\text{l}$ de una solución al 5 % de ácido sulfosalicílico (SSA) (Sigma), para desproteinizar la muestra. Con el fin de retirar restos celulares, los lisados se centrifugaron a $10.000 \times g$ a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue rápidamente congelado con nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta el momento de su utilización, un máximo de diez días.

Determinación de GSH mediante ensayos enzimáticos.

El ensayo se realizó siguiendo el método descrito por [Tietze \(1969\)](#). El compuesto DTNB (5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), también conocido como reactivo de Ellman, reacciona con el GSH de forma no enzimática produciendo GSSG y ácido 2-nitro-5-benzoico que posee

color amarillo. La GR, reduce el GSSG a GSH que reacciona otra vez con el DTNB para producir más ácido y de esta forma aumentar la sensibilidad del método. En este método se cuantifica el glutatión total, es decir, tanto el GSH reducido como la forma oxidada, GSSG.

Estos ensayos se realizaron en microplacas de 96 pocillos con un volumen final de 200 μ l por pocillo y conteniendo cada uno de ellos: tampón fosfato de potasio, 1 mM EDTA, 48 μ M NADPH (Roche), 0,031 mg/ml DTNB (Sigma), 0,115 unidades/ml GR (Sigma) y 20 μ l de los extractos celulares o de una solución control de GSH (Sigma) a diversas concentraciones para construir una recta patrón.

El orden de adicción en todas las reacciones fue el siguiente: primero los 20 μ l de cada muestra, la enzima GR y el NADPH. La incubación se realizó en placa, a 37 °C durante 10 minutos. Posteriormente se añadió el DTNB y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Inmediatamente después se procedió a la lectura espectrofotométrica a 405 nm.

Análisis de datos.

El análisis estadístico de estos experimentos fue análogo al realizado con las muestras determinadas por citometría de flujo.

6. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES CODIFICANTES DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.

6.1 Obtención de las secuencias de genes y análisis *in silico*.

En 2006 se publicó la secuenciación completa del genoma de *Tetrahymena thermophila* (Stover *et al.*, 2006). Las secuencias de los posibles genes se encuentran depositadas en la base de datos TGD (*Tetrahymena Genome Database*), alojada en la página web www.ciliate.org. En esta página se obtuvieron las secuencias de los genes de *T. thermophila* que nos interesaban: genes codificantes para GCL, GSTs, TrxRs y TrySs. Para hacer comparaciones de secuencias y árboles filogenéticos, se recabaron las secuencias de dichos genes de *Paramecium tetraurelia* de la página web <http://paramecium.cgm.cnrs-gif.fr/> y las secuencias disponibles, procedentes de otros organismos/microorganismos de la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), cuya página web es <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Las páginas web de acceso a las bases de datos consultadas en este estudio se muestran en la Tabla 7.

Matrices de identidad.

Las matrices de identidad que aparecen en este trabajo se realizaron con la herramienta SIAS disponible en el servicio <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html> (Tabla 8).

Bases de datos	Página web de acceso	Aplicación
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	Búsqueda de secuencias similares
Expaty	http://www.expasy.ch/	Servidor de múltiples herramientas para el análisis de proteínas
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Bases de datos de secuencias, publicaciones científicas y diversas herramientas biotecnológicas
Conserved domain NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi	Búsqueda de motivos, dominios o patrones conservados en secuencias aminoácídicas
PDB	http://paramecium.cgm.cnrs-gif.fr	Base de datos del genoma macronuclear secuenciado de <i>P. tetraurelia</i>
TGD	http://ciliate.org	Base de datos del genoma macronuclear secuenciado de <i>T. thermophila</i>
TGED	http://tged.ihb.ac.cn/	Base de datos de expresión de genes de <i>T. thermophila</i>
UNIGENE	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene	Base de datos de expresión de genes

Tabla 7. Bases de datos.

Programa informático	Página web de acceso	Aplicación
CORE	http://tcoffee.org/	Evaluación de un alineamiento múltiple de secuencias
Jalview v.2	http://www.jalview.org/	Edición de alineamientos de múltiples secuencias aminoácídicas
MEME v.4.0	http://meme.sdsc.edu/meme	Búsqueda de motivos conservados en secuencias nucleotídicas
Njplot v.2.2	http://pbil.uni-lyon.fr/software/njplot.html	Visualización de árboles filogenéticos
PHYLP v.3.67	http://bioweb2.pasteur.fr/phylogeny/intro-en.html	Construcción de árboles filogenéticos por el método de inferencia basado en distancias filogenéticas
Phylo dendron v.0.8d	http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html	Visualización de árboles filogenéticos
Phyre	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre	Predicción de la estructura tridimensional de una proteína
Protest v.1.4	http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html	Selección de modelos evolutivos
REST@-MCS v.2	www.wzw.tum.de/gene-quantification	Análisis de datos de RT-PCR a tiempo real
SECISEARCH	http://genome.unl.edu/SECISearch.html	Búsqueda de posibles estructuras secundarias de ARN que codifiquen para selenocisteínas
SIAS	http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html	Obtención de matrices de identidad de secuencia
TCoffee	http://www.tcoffee.org	Alineamiento de múltiples secuencias
TMHMM-2.0	www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0	Predicción de dominios transmembrana

Tabla 8. Direcciones web de los principales programas informáticos utilizados en este trabajo.

Árboles filogenéticos.

Los alineamientos necesarios para la construcción de los árboles se elaboraron con la herramienta T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000) disponible en el servidor <http://www.ebi.ac.uk/Tools/t-coffee/index.html>. Una vez obtenidos los alineamientos, se editaron con el programa Jalview con el fin de minimizar el número de *gaps* (huecos). En base a estos alineamientos se construyeron unas matrices de distancias con la herramienta Protdist del software Phylip (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/MobyliPortal/portal.py?form=protdist>). Para transformar la matriz de distancias en las guías de un árbol, se seleccionó el método Neighbor Joining (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/MobyliPortal/portal.py?form=protdist>). Nos servimos del software Phylodendron v0.8d (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html>) para visualizar los árboles definidos por las matrices de distancias.

Búsqueda de posibles secuencias SECIS (selenocisteínas).

La selenocisteína es un aminoácido poco común, codificado por el codón UGA, que generalmente se traduce como *Stop* y finaliza la biosíntesis de la proteína. Sin embargo, en determinadas ocasiones y, en función de la estructura secundaria que adopte el ARNm, el codón UGA se traduce como selenocisteína. Se localizaron las secuencias que podrían codificar selenocisteínas utilizando la herramienta SECISEARCH disponible en la página web <http://genome.unl.edu/SECISearch.html> (Krykov *et al.*, 2003). (Tabla 8).

Obtención de ESTs (secuencias expresadas).

Diversos grupos han realizado genotecas de expresión de *Tetrahymena thermophila* en diferentes condiciones: crecimiento vegetativo, conjugación, inanición y tratamientos con diversos agentes como metales pesados o compuestos químicos (Miao *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007). Las secuencias expresadas hasta el momento están recogidas en un banco de datos público en la página <http://tged.ihb.ac.cn/>. (Tabla 7).

6.2 Análisis de la expresión.

Para analizar los efectos de las diferentes condiciones de estrés en la expresión de los genes seleccionados, se aisló el ARN de cultivos de *T. thermophila*, previamente sometidos a dichas condiciones de estrés, y se aplicó el método de RT-PCR cuantitativa.

6.2.1 Tratamientos.

50 ml de *Tetrahymena thermophila* en fase exponencial tardía ($1-3 \times 10^5$ células/ml) fueron sometidos a diferentes condiciones estresantes como son metales pesados y agentes oxidantes. Como en los experimentos anteriores, todas las soluciones destinadas a los diferentes tratamientos, se prepararon 10 veces más concentradas. Las soluciones de metales pesados se prepararon a partir de sales metálicas, diluyéndose directamente en medio PP210. En la Tabla 9 se muestran los diferentes tratamientos, su concentración final y el tiempo de exposición. Como agentes inductores de estrés oxidativo se utilizaron el paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) (Sigma) y la menadiona (MD) (2-metil-1,4-naftoquinona) (Sigma). El paraquat (PQ) se diluyó en medio PP210, mientras que con la menadiona (MD) se preparó primeramente una solución 5 M en cloroformo a partir de la cual se obtuvo una solución 50 mM en medio PP210 que se utilizó para el tratamiento de los cultivos. Además se analizó el tratamiento con CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzénico), un inductor de las GSTs. Se preparó una solución 10 mM CDNB (Sigma) en etanol. A partir de esta, se realizó una dilución 1/5 hasta conseguir una concentración 2 mM en PP210.

Agente	Compuesto	Concentración (μM)	Medio	Tiempo de exposición (h)
Metales pesados:				
Cadmio (Cd ²⁺)	CdCl ₂	44	PP210	2-24
Cobre (Cu ²⁺)	CuSO ₄ •5H ₂ O	400	PP210	2-24
Arseniato (As ⁵⁺)	Na ₂ HAsO ₄ •7H ₂ O	100	PP210	2-24
Zinc (Zn ²⁺)	ZnSO ₄ •7H ₂ O	3.500	PP210	2-24
Plomo (Pb ²⁺)	Pb(NO ₃) ₂	950	PP210	2-24
Oxidantes:				
Paraquat (PQ)	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ N ₂	7.800	PP210	24
Menadiona(MD)	C ₁₁ H ₈ O ₂	5.000	PP210	2
CDNB	ClC ₆ H ₃ (NO) ₂	200	PP210	2
Otro tipo de estrés:				
pH5	-	-	PP210	24
pH 9	-	-	PP210	24
Inanición	-	-	Tris-HCl	24

Tabla 9. Tratamientos inductores de estrés celular utilizados en el análisis de la expresión de genes antioxidantes.

6.2.2 Aislamiento de ARN total.

Para el aislamiento de ARN total, los cultivos de *Tetrahymena* ($\approx 1-3 \times 10^5$ células/ml) fueron centrifugados a 500 x g durante 3 minutos. El pellet celular fue lavado en tampón Tris-HCl e inmediatamente resuspendido en el tampón de lisis RTL (Qiagen) conteniendo 1 % de β -mercaptoetanol (Blo-Rad), continuando así con el protocolo de extracción suministrado en el Kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen). Tanto el material como las soluciones empleadas para el aislamiento del ARN fueron tratados con H₂O-DEPC (Tabla 4).

Para eliminar la posible contaminación con ADN celular, todas las muestras fueron tratadas con DNasa I libre de RNasa en presencia del tampón de la enzima (Tabla 3) durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, se inactivó la enzima añadiendo 0,1 % (v/v) del reactivo de inactivación suministrado por el kit RNAqueos™-4PCR (Ambion) y el ARN total se conservó a -80 °C hasta su utilización. La concentración del ARN se determinó a partir de la absorbancia a 260 nm mediante la ecuación $[\text{ARN}](\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times D \times 40$, donde D es el factor de dilución empleado. El grado de pureza se estimó como el cociente entre las absorbancias a 260 y 280 nm, obteniendo valores dentro del intervalo 1,8-2,1. El grado de integridad se determinó mediante electroforesis de ARN en geles desnaturizantes de agarosa al 1,2%, empleando como referencia la integridad de las bandas correspondientes a los ARN ribosómicos, muchos más abundantes que el resto de las poblaciones de ARNs.

6.2.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc).

Para transformar el ARN en ADNc se utilizó el kit *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* (AMV) (Roche). Antes de proceder a la síntesis del ADNc, el ARN se desnaturalizó calentándolo a 65 °C durante 15 minutos. La reacción de síntesis tuvo lugar en un volumen final de 20 μ l conteniendo: 3 μ g de ARN, 5 mM MgCl₂, 1 mM de la mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), 3,2 μ g de cebadores de secuencia arbitraria, 50 unidades del inhibidor de RNasas y 20 unidades de la transcriptasa reversa AMV. Esta reacción se incubó en el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) según el protocolo suministrado con el kit. Una vez obtenidos los ADNc, se conservaron a -20 °C hasta el momento de su utilización. Para todos los experimentos siguientes se utilizó una dilución 1/10 del ADNc obtenido por este método.

6.2.4 RT-PCR a tiempo real.

Para realizar un análisis de la expresión de los diferentes genes a nivel cuantitativo realizamos una RT-PCR a tiempo real. Se requiere un control endógeno o gen de mantenimiento, cuya expresión se mantenga relativamente constante en las diferentes condiciones del experimento, con el fin de corregir diferencias de expresión relacionadas con diferencias en la cantidad de ARN de partida. En nuestro caso, se utilizó el gen que codifica para la β -tubulina. Los cebadores utilizados en estas amplificaciones fueron diseñados con el programa Oligo Xpress™ y se muestran en la Tabla 10. Para cada gen a analizar, incluido la β -tubulina, se prepararon unas mezclas que contenían: 0,2 μ M de cada uno de los dos cebadores (concentraciones finales tras añadir el ADNc) y la mezcla SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems), que contiene dNTPs, la enzima AmpliTaq Gold® y los componentes necesarios para que se produzca y se detecte la reacción de polimerización. Se repartieron 16 μ l de estas mezclas en cada uno de los pocillos de las placas de 96 pocillos (Applied Biosystems). Posteriormente, se incorporó a cada pocillo 4 μ l de ADNc de muestras control o bien 4 μ l de las muestras provenientes de los distintos tratamientos. Son necesarios también controles negativos o NTC (*no template control*), en los que se añadieron 4 μ l de agua, para analizar la posible contaminación de los distintos componentes de la mezcla de reacción. Todas las muestras se realizaron por duplicado. En todas las placas, además de estar presentes los controles NTC, las muestras de condiciones control y las de tratamientos, se incorporaron al menos cuatro pocillos con diluciones decimales de un mismo ADNc molde para cada juego de cebadores. De esta forma se construye una recta patrón enfrentando el ciclo donde aparece la señal frente al logaritmo decimal de la concentración de molde (Figura 20). A partir de la pendiente de esta recta, podemos calcular la eficacia en amplificación aplicando la fórmula:

Eficacia= $[10^{(-1/s)}]$, donde s es la pendiente de la recta.

En la Tabla 11 se recogen los parámetros de la recta patrón para cada par de cebadores utilizados en este estudio.

Para cada ARN de nueva extracción, se realizaron controles RT⁻, es decir, controles en los que se incorporaba el ARN no transformado en ADNc, para comprobar que no existía contaminación con ADN genómico.

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Longitud del cebador	Temperatura desnaturalización (°C)	Longitud del fragmento amplificado (n° nucleótidos)	Temperatura desnaturalización del producto (°C)
TtATUB	TtATUB1	TGTCGTCCCCAAGGAT	16	41	54	79
	TtATUB2	GTTCTCTGGTCTTTGATGGT	20	45		
TtATUBS	TtATUBS1	ATAACTCTCCGTTGCTGAA	19	43	67	74
	TtATUBS2	ATCACACTAGCCCATCATGT	20	42		
	Sonda 8	CTGCCCTTC	8	-		
TtGCL	TtGCLA	AGAAATTCAGAACTATGGAATGCTA	24	56	54	68
	TtGCLB	ATGAAAAGCAGCGTTCTCATC	20	57		
TtGSTM3	TtGSTM3A	CTATAGGAGCTGGGATCACT	20	47	61	66
	TtGSTM3B	GAAAAAGCACCATGATACC	19	42		
TtGSTM4	TtGSTM4A	TTGGTATTTACTATGACGATCC	22	44	61	64
	TtGSTM4B	AGAGCAGCTCTTGCTTAATT	20	43		
TtGSTM9	TtGSTM9A	GGGGAATTTAAGCTTACTGA	20	43	67	70
	TtGSTM9B	CAGCTCTTTGTATTTCCTG	20	43		
	Sonda 41	CTTCAGCC	8	-		
TtGSTM15	TtGSTM15A	GGAATCTATCCCGAAGAATT	20	43	61	70
	TtGSTM15B	CAAAACGGGCTTGGA	15	37		
TtGSTM17	TtGSTM17A	ATTTTCTCTGAGCCTGAATAGG	22	52	133	70
	TtGSTM17B	CTATATACTTGATTACAAC	19	42		
TtGSTM27	TtGSTM27A	GCAAACATTTTGATCCAGTTAAC	23	45	102	68
	TtGSTM27B	TGCCAGTTTCATCGCATACAT	20	45		
TtGSTM40	TtGSTM40A	CTGTAAAGGATAAAAGAC	17	36	251	73
	TtGSTM40B	TCGATGACATAAATTTACAAC	20	38		
TtGSTM41	TtGSTM41A	TATGTCTGTGATGGGTTGAT	20	43	107	68
	TtGSTM41B	AATGAGTATAGATCAGG	17	35		
TtGSTM46	TtGSTM46A	TCATCGCTCAAGTCCTTAC	19	44	132	70
	TtGSTM46B	ATTTGAGTGAAGACATC	17	35		
TtGSTM47	TtGSTM47A	TGAGCTTATGTTTCATCGC	18	43	151	71
	TtGSTM47B	GATAACGAATGATTTGTTGTATC	23	43		

Tabla 10. Cebadores utilizados para la RT-PCR a tiempo real. Continúa en la página siguiente.

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Longitud del cebador	Temperatura desnaturalización (°C)	Longitud del fragmento amplificado (n° nucleótidos)	Temperatura desnaturalización del producto (°C)
TiGSTO1	TiGSTO1A	ATATTACTGCTACTAACGAACCT	23	47	103	70
	TiGSTO1B	TCATATGGTACTTAGAGGAG	20	43		
TiGSTO6	TiGSTO6A	ATGTCATAACCCACAC	16	38	100	69
	TiGSTO6B	CATAATCGTATTAAAGTTTCAAGGC	25	44		
TiGSTT1	TiGSTT1A	GAGTATTAAAACTTATCTTAGC	23	41	94	67
	TiGSTT1B	GAGAAAAATATCAACAGTCATG	21	41		
TiGSTT3	TiGSTT3A	ATGACAAACAAACCAAGCA	19	39	120	70
	TiGSTT3B	TTTAATCTAACTTCTACCAAC	22	40		
TiGSTZ1	TiGSTZ1A	TTAAAGTATGGAGACGAGGTTA	22	44	185	72
	TiGSTZ1B	TCAATCTTATTAAAGCACCCCTCA	22	44		
TiGSTZ2	TiGSTZ2A	CAGTGCTATTATCCCTAT	19	42	65	64
	TiGSTZ2B	TCATATTGCCTTCTTTTC	19	37		
TiGSTN1	TiGSTN1A	ATTATAGATTTTAGTGCTCTTTAG	23	41	95	68
	TiGSTN1B	CAACTACTACATGCTTCAAA	20	41		
TiGSTN2	TiGSTN2A	GCAATTAGATATCACCAAGG	20	24	61	67
	TiGSTN2B	GGTGTGGTCCAGTAGTTTC	20	43		
TiTrxRed1	TiTrx1A	GAAGAGAGGGTGAAGCCTAA	20	29	71	76
	TiTrx1B	AACTGCCCTATCCATAAGC	19	48		
TiTrxRed2	TiTrx2A	GCTACCAAGGCAGATTTTG	19	44	72	74
	TiTrx2B	CTTGAGAAGCACCAACTCTT	20	45		
TiTrxRed3	TiTrx3A	ATCCAACATGTGCAGAAGA	19	42	56	69
	TiTrx3B	CTCACCAAGAGCTTTTGTAAAC	21	45		
TiTrxRed4	TiTrx4A	GGACCTAATGCAGGAGAAGT	20	47	57	72
	TiTrx4B	CATCCCTAATTTTCATAGCAACT	22	43		
TTHERM_00723630	TT00723630A	AATTCATGGATCAGGTAACA	20	41	60	69
	TT00723630B	GATGTGGCCTAGGTACTAAAC	21	47		
TiTrxRed5	TiTrx5A	TTTGCAATAGGAGATGCTGTT	21	52	63	68
	TiTrx5B	CCCTTATTTTATTGCCACAGG	21	52		
TiGR1	TiGR1A	ACTTAGACAGGTGAAC	16	36	94	73
	TiGR1B	ACTCAAGGTTAACGCC	16	38		
TiTryS2	TiTryS2A	GGAGGAGGTTCTAGTTCATAATA	23	47	79	69
	TiTryS2B	AAGGCTTACTAAATTTCTATGC	22	42		
TiTryS4	TiTryS4A	GTAAGCTATCGACTACCAGC	20	47	61	69
	TiTryS4B	TGATATGCGTAAATTGAAACA	20	38		

Tabla 10. Cebadores utilizados para la RT-PCRa tiempo real. Comienza en la página anterior.

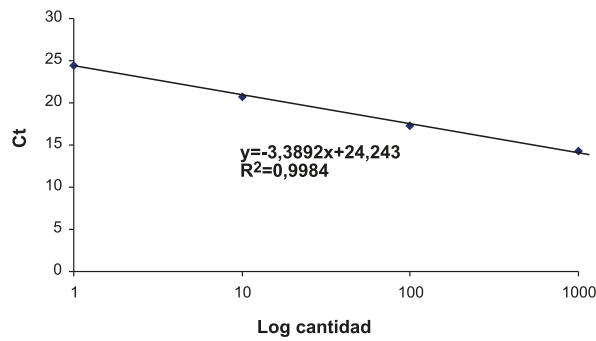


Figura 20. Recta patrón correspondiente al gen de la α -tubulina de *Tetrahymena thermophila* de una RT-PCR a tiempo real. Se muestra el ciclo donde se detecta la señal frente al logaritmo de la concentración del ADN de partida. La pendiente de esta recta es un indicador del funcionamiento de la reacción.

Gen	E	s	R ²	Gen	E	s	R ²
<i>TtATUB</i>	1,94	-3,47	1,00	<i>TtGSTT1</i>	1,86	-3,71	1,00
<i>TtATUBS</i>	1,95	-3,44	1,00	<i>TtGSTT3</i>	1,84	-3,76	0,98
<i>TtGCL</i>	1,90	-3,60	0,99	<i>TtGSTZ1</i>	1,87	-3,68	1,00
<i>TtGSTM3</i>	2,11	-3,09	1,00	<i>TtGSTZ2</i>	1,90	-3,59	1,00
<i>TtGSTM4</i>	2,02	-3,28	1,00	<i>TtGSTN1</i>	1,88	-3,65	1,00
<i>TtGSTM9</i>	2,00	-3,33	1,00	<i>TtGSTN2</i>	1,93	-3,49	0,95
<i>TtGSTM15</i>	1,96	-3,41	0,99	<i>TtTrxRed1</i>	1,80	-3,90	1,00
<i>TtGSTM17</i>	1,89	-3,62	1,00	<i>TtTrxRed2</i>	1,99	-3,35	1,00
<i>TtGSTM27</i>	1,95	-3,44	1,00	<i>TtTrxRed3</i>	2,05	-3,20	0,99
<i>TtGSTM40</i>	1,90	-3,59	1,00	<i>TtTrxRed4</i>	1,89	-3,60	1,00
<i>TtGSTM41</i>	1,93	-3,50	0,94	<i>TtTrxRed5</i>	2,06	-3,18	1,00
<i>TtGSTM46</i>	1,99	-3,36	1,00	<i>TtGR1</i>	1,97	-3,40	1,00
<i>TtGSTM47</i>	1,95	-3,44	0,99	<i>TtTryS2</i>	2,02	-3,27	0,98
<i>TtGSTO1</i>	2,10	-3,11	1,00	<i>TtTryS4</i>	1,93	-3,52	0,99
<i>TtGSTO6</i>	1,89	-3,60	1,00				

Tabla 11. Parámetros de la recta patrón obtenida para cada uno de los genes analizados por RT-PCR cuantitativa, incluido el gen control endógeno (*TtATUB*). E: eficacia de la amplificación calculada a partir de la ecuación $E = 10 \times (-1/s)$, s: pendiente de la recta, y R^2 : coeficiente de correlación.

El gen *TtGSTM9* se analizó con una variación de la PCR cuantitativa. En este caso se utilizaron sondas TaqMan. Las mezclas eran similares, pero en lugar de SBYR, se prepararon con FastStart TaqMan® ProbeMaster (Roche), adicionando además de los cebadores correspondientes, 0,2 μ l por reacción de las sondas que aparecen en la Tabla 10. Para el gen *TtGSTM9* se utilizó la sonda número 41 de la librería de sondas de humanos de Roche (Universal ProbeLibrary Probes Probe#41) y para el gen de mantenimiento, el gen de la tubulina, se usó la sonda número 8 (Universal ProbeLibrary Probes Probe#8).

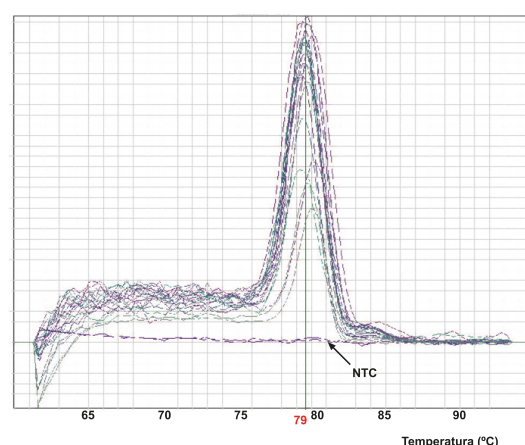
En todos los casos, se utilizó el termociclador ABI PRISM® 7900 HT Time PCR System y las condiciones que se describen a continuación:

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Activación de la enzima	95	10 min.
40 ciclos:		
-Desnaturalización	95	15 seg.
-Polimerización	50	1 min.
Curvas de desnaturalización		
-Desnaturalización	95	15 seg.
-Polimerización*	50	15 seg.
Desnaturalización	95	15 seg.

*la recogida de datos se realiza durante la rampa de calentamiento entre 60 y 90 °C.

Al finalizar la PCR es necesario realizar una curva de desnaturalización, para verificar que los cebadores tienen una única diana y por tanto los cebadores utilizados son específicos del gen a analizar. Al aumentar la temperatura, se desnaturaliza el ADN y se pierde la señal de fluorescencia. Esto es lo que se muestra en la Figura 21. Si los cebadores amplifican sólo una secuencia, aparece un único pico. Los controles NTC al no llevar ningún tipo de ADN molde, nos permiten detectar la amplificación de dímeros. Para comprobar que esta secuencia se corresponde con el gen que nos interesa, se clonaron los fragmentos amplificados y se secuenciaron como se explicará posteriormente.

Figura 21. Curva de desnaturalización del gen de la α -tubulina en una RT-PCR a tiempo real. Aparece un único pico de desnaturalización de 79 °C, temperatura de desnaturalización (T_m) del producto amplificado por los cebadores TtATUB1 y TtATUB2. En las distintas muestras analizadas, se observa un único pico, correspondiente a un único amplicón con una T_m característica. Se observa también como el control negativo NTC (señalado por una flecha negra) no produce amplificación.



Para analizar los datos de PCR cuantitativa existen dos métodos, la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa. En la cuantificación absoluta se calcula la cantidad total de ADNc de partida de cada muestra. El objetivo del método de la cuantificación relativa es conocer la razón entre la cantidad de ADNc de origen de una muestra tratada y la de una muestra control. En nuestro caso utilizamos la herramienta informática REST®-MCS v2 (Pfaffl *et al.*, 2002) dispo-

nible en la dirección de internet www.wzw.tum.de/gene-quantification. Se trata de un método de cuantificación relativa basado en el algoritmo:

$$R = \frac{(E_{\text{gen}})^{Ct_{\text{gen}}(\text{control-tratamiento})}}{(E_{\text{tub}})^{Ct_{\text{tub}}(\text{control-tratamiento})}}$$

donde E es la eficacia de amplificación de cada gen y Ct el ciclo donde la fluorescencia supera un determinado umbral previamente fijado. Así la razón nos indicaría el grado de inducción de un gen

en un tratamiento respecto a las condiciones control. Además el programa analiza estadísticamente los datos, mediante el test Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test© (diferencia entre medias). Este test calcula la probabilidad de que la diferencia entre la media del control y la media del tratamiento ocurra al azar. La hipótesis nula es que el tratamiento no produce efecto, así cuando el valor p es inferior a 0,05 podemos decir, que la diferencia entre medias es significativa y que por tanto hay efecto del tratamiento.

6.2.5 Comprobación de los genes amplificados.

Para asegurar que los fragmentos que estábamos amplificando pertenecían a los genes que pretendíamos estudiar, se secuenciaron estos fragmentos. Para lo cual, estos fragmentos se insertaron en un vector adecuado.

6.2.5.1 Clonación y transformación.

Para la clonación de los amplicones en el vector pCR 2.1 TOPO se siguieron las instrucciones suministradas en el kit comercial TOPO™ TA Cloning (Invitrogen), que se basa en la metodología denominada TA cloning. Los amplicones producidos por la enzima Taq ADN polimerasa presentan en sus extremos 3' un residuo de dATP, formando extremos protuberantes. Como resultado de esto el producto de PCR puede ser directamente ligado al vector, que presenta extremos 3'-T complementarios, gracias a la acción de la enzima topoisomerasa I del virus *Vaccinia* incluida en el vector. Cada reacción de clonación fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente, conteniendo un volumen total de 6 µl: 4 µl de producto de PCR, 1 µl de vector pCR 2.1 TOPO y 1 µl de solución salina (NaCl 1,2 M y MgCl₂ 0,06 M).

Las construcciones así realizadas fueron introducidas en *E. coli* mediante transformación por choque térmico. Para ello 4 µl de la reacción de ligación fueron incubados durante 30 minutos en hielo junto con las bacterias competentes *One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli* (Invitrogen). El choque térmico se llevó a cabo incubando las bacterias a 42 °C durante 30 segundos y posteriormente en hielo durante 5 minutos. A continuación, las bacterias fueron

incubadas en 250 µl de medio SOC (Invitrogen) a 37 °C durante 1 h en agitación suave, y finalmente sembradas en césped sobre placas de LB agar (Pronadisa) suplementado con kanamicina 50 µg/ml (Sigma).

La selección de las bacterias transformantes se realizó utilizando como marcador la resistencia a kanamicina. La selección de colonias transformantes y recombinantes se realizó añadiendo 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-gal) 40 mg/ml (Sigma) al medio y analizando la actividad β-galactosidasa. Las bacterias con el vector recombinante presentan color blanco, mientras que las no recombinantes son de color azul. Las colonias seleccionadas (blancas) fueron aisladas del agar y resembradas en medio LB líquido conteniendo kanamicina 50 µg/ml, donde se incubaron a 37 °C durante 16-18 horas en agitación para procederes posteriormente al aislamiento del ADN plasmídico.

6.2.5.2 Aislamiento de los plásmidos y detección de los insertos clonados.

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizó el kit QIAprep Spin MiniprepKit (Qiagen). Este procedimiento se basa en la lisis alcalina de las bacterias y posterior precipitación del ADN cromosómico y restos celulares por centrifugación. El ADN plasmídico que se encuentra en el sobrenadante se une a una columna de fibra de vidrio en presencia de alta concentración de sales. Tras varios pasos de lavado, el ADN plasmídico es eluido con tampón a baja concentración de sales y se conserva a -20 °C hasta el momento de su utilización. Para visualizar el tamaño del inserto, el vector, fue previamente digerido con 10 unidades de la endonucleasa EcoRI (Roche) en un volumen total de 20 µl conteniendo el tampón H (ver Tabla 3) durante 1 hora a 37 °C. Los productos de la digestión fueron separados en electroforesis con geles de agarosa al 1,5%.

La secuenciación se llevó a cabo por el método didesoxi (Hindley, 1983), usando los cebadores M-13 y el kit comercial Big-dye™ (Applied Biosystems), en el secuenciador automático 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) del Servicio de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid.

7. MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS.

7.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Las electroforesis estándar de ADN se realizaron en geles de agarosa (Pronadisa) al 1,5% en tampón TAE 1x (Tabla 3) tal y como se describe en Sambrook and Russell (2001). Los geles se corrieron a 10 V/cm durante 25 minutos y tras tinción con bromuro de etidio (Sigma) 1 µg/ml

y desteñido en agua destilada, fueron visualizados bajo luz UV de 320 nm (UVI-pro Platinum System, Durviz, S.L.). Los marcadores de tamaño molecular de ADN empleados fueron M 1kb, M-II o M-VI (Roche) que presentan unos rangos de tamaño (23-0,125 kb, 2,1-0,154 kb, y 11,1-0,19 kb respectivamente.

7.2 Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes de agarosa.

Las electroforesis de ARN se realizaron en geles de agarosa al 1,2% (Pronadisa) conteniendo formaldehído 2,2 M (Merck) como agente desnaturalizante, de acuerdo al protocolo descrito en [Sambrook and Rusell \(2001\)](#). Las muestras de ARN fueron incubadas a 65 °C durante 3-5 minutos en tampón de carga 5x (Tabla 3). Tras lo cual, se añadió a las muestras bromuro de etidio 1 µg/ml. Los geles fueron resueltos a 10 V/cm durante 1h en tampón de electroforesis de ARN pH8 1x (Tabla 3) y finalmente el ARN fue visualizado bajo luz ultravioleta (UVI-pro Platinum System, Durviz, S.L.). Tanto el material como las soluciones empleadas fueron tratados con H₂O-DEPC con el fin de inactivar las RNasas presentes.

8. DETERMINACIÓN DE TIOLES DE BAJO PESO MOLECULAR POR HPLC.

8.1 Preparación de las muestras y separación por cromatografía.

Con el fin de detectar tripanotión o su precursor (glutathionil espermidina) se procedió al análisis mediante HPLC de extractos celulares de *T. thermophila* en diferentes fases de su crecimiento y bajo diversos tratamientos. Los tratamientos fueron con dos metales (Cu ó Zn) y el agente CDNB, en las concentraciones indicadas en la Tabla 9.

Para valorar los tioles de bajo peso molecular, se recogieron por centrifugación (500 x g, 3 minutos) un número aproximado de 10⁶ células. Previamente, se había comprobado que este valor se encontraba dentro del rango en el cual la medida de GSH es lineal. Las células se lavaron dos veces con tampón Tris-HCl y se resuspendieron en 50 µl de tampón HEPPS. Seguidamente, se procedió a la preparación de las muestras añadiendo 50 µl de una solución de monobromobimano 2 mM en etanol absoluto (concentración final 0,5 mM). Estas muestras se calentaron a 70 °C durante 3 minutos y se enfriaron rápidamente en hielo. Se añadieron 100 µl de una solución 4 mM de ácido metanosulfónico, ajustada a pH 1,6 con LiOH. Después de mantener estas muestras en hielo durante 30 minutos, se centrifugaron a 7.000 x g durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. Las muestras obtenidas de esta forma, fueron separadas en columnas de cromatografía de alta resolución (HPLC) según se describe en [Fairlamb et al., 1987](#).

La columna utilizada fue ULTRASPHERE IP de 250 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro, con un gradiente de dos solventes: solvente A y solvente B (ver Tabla 4). El gradiente aplicado fue: 20 minutos con una mezcla de los dos solventes (90 % de A+10 % de B), 40 minutos de un gradiente linear que va desde del 10 % de B al 50 %, seguido de 10 minutos con una solución al 50 % de ambos solventes.

En las muestras correspondientes a diferentes estadios del crecimiento de una población de *T. thermophila*, se aplicaron 5 µl de la muestra en el cromatógrafo Ultimate 3000 acoplado a un detector de fluorescencia. Los tioles unidos al monobromobimano, fueron identificados con excitación a 360 nm y emisión a 450 nm. En los tratamientos con metales o agentes inductores de estrés se utilizó un cromatógrafo asociado a un lector de absorbancia (ÄKTA, Amersham Pharmacia Biotech), por lo que la presencia de grupos tioles se detectó a 395 nm. En este caso debido a la menor sensibilidad del sistema de detección se aplicaron 100 µl.

8.2 Determinación de los pesos moleculares por espectrometría de masas.

Con el fin de identificar los picos separados en el HPLC, se determinaron las masas moleculares por espectrometría de masas. La determinación de la distribución de los pesos moleculares de las biomoléculas (MH^+) se realizó utilizando un espectrómetro de masas en tándem, 4.800 MALDI TOF/TOF analyzer de Applied Biosystems, equipado con un laser Diode-pumped Nd:YAG a 355 nm (800 disparos/espectro), midiendo en modo reflector positivo, con una voltaje aceleración de 20.000 v y optimizando el tiempo de retardo y el gradiente de potencial para enfocar en el rango de masa de 500 a 2.000 Da.

9. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS GR, TryR y TryS.

9.1 Obtención del extracto celular de *Tetrahymena thermophila*.

Se obtuvo un cultivo de 2 litros de *T. thermophila* como se describe en la sección 3.1. Cuando se alcanzó la concentración de $1-3 \times 10^5$ células/ml (fase exponencial tardía), las células se recogieron por centrifugación a $3.000 \times g$ durante 10 minutos y se lavaron dos veces con tampón Tris-HCl. A continuación se resuspendieron en un volumen de 15 ml de tampón de lisis (tampón fosfato de potasio y 15 µl de una mezcla de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail Set III, Calbiochem). Las células se lisaron bajo presión (30 Kpsi) utilizando el One-Shot® Cell Disruptor (Constant System). Para eliminar restos celulares y proteínas de alto peso molecular, el lisado se centrifugó durante una hora a $100.000 \times g$ a 4 °C. El sobrenadante

se dializó con dos volúmenes del mismo tampón de lisis usando las membranas Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (3.500MWCO) (Thermo Scientific). La concentración de proteínas se cuantificó por el método de Bradford con el kit comercial Bio-Rad Protein Assay. En cada caso, se restó la cantidad de inhibidores de proteasas añadidos anteriormente. La muestra se distribuyó en alícuotas que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Una vez descongeladas, estas alícuotas se utilizaron exclusivamente una vez.

9.2 Determinación de la actividad tripanotión sintetasa.

La actividad tripanotión sintetasa se analizó mediante la detección del producto de la reacción $\text{SPD} + \text{GSH} + \text{ATP} + \text{NADPH} \rightarrow \text{Gsp} + \text{T[SH]}_2 + \text{NADP}^+ + \text{ADP}$ por HPLC. Con este fin, diferentes concentraciones (0,1-0,5 mg de proteínas) de un extracto celular de *Tetrahymena thermophila* obtenido como se explica anteriormente, se incubaron durante 1 hora a 37 °C con los siguientes compuestos: 0,8 mM GSH, 0,8 mM espermidina, 2 mM ATP, 5 mM MgSO_4 , 0,5 mM NADPH, 1 mM EDTA y 0,5 unidades de la enzima recombinante TR de *Crithidia*. 10 µl de esta reacción fueron analizados por HPLC previa derivatización con mBrB como se explica en el apartado 3.8.1. Como control positivo de la síntesis de tripanotión o de su intermediario, el glutamilespermidina, se utilizaron la enzimas recombinantes tripanotión sintetasa y glutationilespermidina respectivamente, del protozoo *Crithidia fasciculata*, a una concentración de 1 µM. Como control negativo, se preparó una solución del extracto a la concentración más elevada (0,5 mg de proteína) que se inactivó, calentando la muestra a 100 °C durante 10 minutos.

9.3 Determinación de la actividad glutatión reductasa y tripanotión reductasa.

Se determinó la actividad oxidoreductasa frente a GSSG o tripanotión oxidado, tanto en muestras control como en muestras tratadas con metales pesados (Cd^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+}) y CDNB en las mismas condiciones en las que se había analizado la expresión de los genes codificantes para estas enzimas (Tabla 9).

La reacción catalizada por la ambas reductasas requiere poder reductor cedido por el NADPH o NADH. La actividad de estas enzimas se determinó espectrofotométricamente a partir del NADP^+ . Se preparó una mezcla que contenía 150 µM NADPH (Sigma) en tampón HEPES. Esta mezcla se colocó a 27 °C en el espectrofotómetro Beckman DU-70 y se inició la lectura de la absorbancia a 340 nm (Figura 22). Se añadieron diferentes cantidades de proteínas (0,1-0,5 mg) del extracto celular de *T. thermophila* obtenido en el apartado anterior, para determinar de esta forma la actividad oxidoreductasa de la muestra no dependiente de glutatión o tripanotión.

Seguidamente se incorporó el sustrato de la reacción que pretendíamos valorar, en una tanda disulfuro de glutatión y en otra tripanotión oxidado, en ambos casos a una concentración final de 50 μM (Figura 22). Se consideró una unidad de actividad enzimática la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μM de NADPH por minuto, utilizando el valor 6,33 como el coeficiente de extinción molar del NADPH. Como controles positivos, se utilizaron unas muestras en las que en lugar de añadir extracto celular se añadieron las enzimas GR humana o TryR de *Crithidia* (0,1 U/ml).

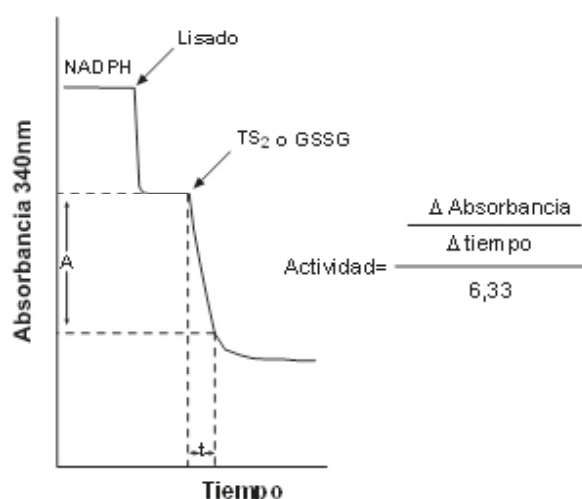


Figura 22. Determinación de la actividad oxidorreductasa. Al incorporar el extracto celular, la absorbancia de la solución disminuye, en parte porque estamos diluyendo el NADPH, y en parte porque en el extracto existen enzimas y otros compuestos que lo oxidan. Esta disminución en la absorbancia es inherente al GSH o al Try. Una vez que esta disminución se estabiliza podemos añadir el sustrato oxidado, GSSG o TS₂. En la zona donde la bajada de absorbancia es lineal con el tiempo podemos cuantificar la actividad oxidorreductasa como la diferencia en los niveles de absorbancia con respecto al tiempo. Debemos tener en cuenta el coeficiente de extinción molar del NADPH ($\epsilon=6,33$).

Introducción

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Resumen de resultados

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

Resultados

1. RELEVANCIA DE LAS MOLÉCULAS CON GRUPOS TIÓLICOS EN LA RESPUESTA -ESTRÉS FRENTE A METALES PESADOS Y OTROS AGENTES CITOTÓXICOS EN EL CILIADO *Tetrahymena thermophila*.

Con el fin de determinar la importancia relativa de las moléculas que presentan grupos tiólicos libres (-SH), en la respuesta celular frente a compuestos citotóxicos, se hicieron valoraciones cuantitativas, tanto de citotoxicidad como de grupos tiólicos totales. Para ello, se utilizaron dos tipos de poblaciones, tratadas o no con los inhibidores BSO o NEM (tratamientos de 2 ó 24 h) que reducen los niveles de glutatión o bloquean los grupos tiólicos, respectivamente. Ambos tipos de poblaciones celulares de *T. thermophila* fueron igualmente expuestas o no (control) a diferentes condiciones de estrés, fundamentalmente estrés oxidativo, mediante la exposición a concentraciones subletales de ciertos metales (Cd^{2+} o As^{5+}), agentes oxidantes (Paraquat, Menadiona) o bien pH ácido. La valoración simultánea de grupos tiólicos y citotoxicidad, se realizó por citometría de flujo, utilizando los fluorocromos CMFDA y ioduro de propidio (IP). Los valores de fluorescencia obtenidos en cada tratamiento con inhibidores, se normalizaron respecto al control en cada experimento. Estos resultados se muestran en las Figuras 23-38. En cada una de estas figuras se incluyen tablas con los valores medios (m) y las desviaciones estándar (ds) tanto de la fluorescencia relativa como de los porcentajes de mortalidad de cada muestra (+BSO y -BSO o +NEM y -NEM) y para cada tratamiento. Igualmente, en otras dos tablas adjuntas (citotoxicidad o grupos tiólicos) se muestran los resultados del análisis estadístico para cada muestra y tratamiento, indicándose entre paréntesis el valor p de cada análisis. Los valores $p < 0,05$ se consideraron significativos y se destacan con sombreado amarillo. Para una mejor comprensión del análisis estadístico consultar el Anexo-I.

Resultados

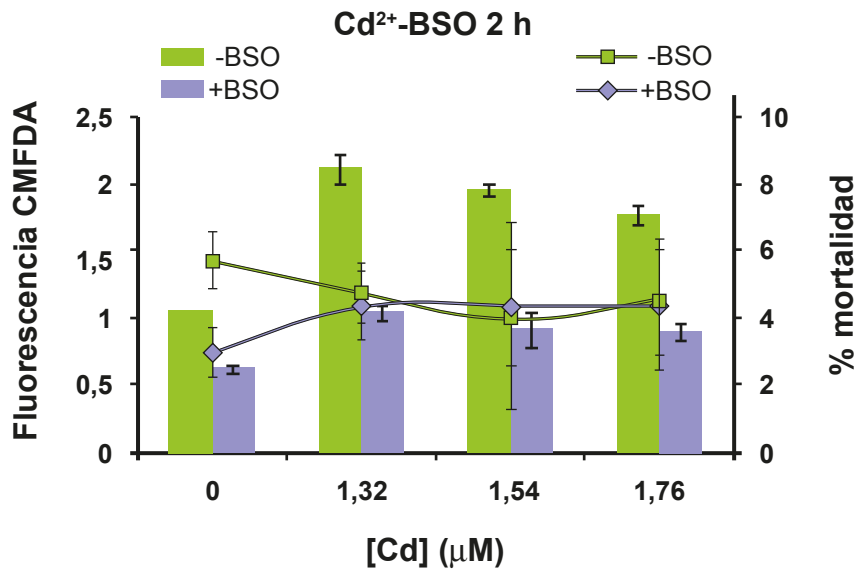


Tabla F23A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

[Cd ²⁺] (μM)	Fluorescencia relativa			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	1	0	0,62	0,02
1,32	2,11	0,12	1,04	0,05
1,54	1,95	0,05	0,91	0,12
1,76	1,77	0,07	0,89	0,07

Tabla F23B.
Mortalidad (IP).

[Cd ²⁺] (μM)	Fluorescencia relativa			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	5,75	0,85	3,01	0,76
1,32	4,75	0,89	4,41	1,02
1,54	4,08	2,79	4,33	1,71
1,76	4,47	1,55	4,44	1,93

Tabla F23C. Estadística CMFDA

Interacción:	Sí (0,000)		
Efecto de BSO:			
Cd ²⁺ (0): (0,000)	Cd ²⁺ (1,32): (0,001)	Cd ²⁺ (1,54): (0,002)	Cd ²⁺ (1,76): (0,000)
Efecto de Cd ²⁺ :			
BSO (-)	0-1,32: (0,004)	1,32-1,54: (0,013)	1,54-1,76: (0,048)
BSO (+)	0-1,32: (0,001)	1,32-1,54: (0,090)	1,54-1,76: (0,539)

Tabla F23D. Estadística IP

Interacción:	NO (0,360)		
Efecto de BSO:	(0,364)		
Efecto de Cd ²⁺ :	0-1,32: (0,763)	1,32-1,54: (0,708)	1,54-1,76: (0,539)

Figura 23. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 2 h a Cd²⁺, en presencia o ausencia de BSO (butionilsulfoximina). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F23A y F23B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F23C y F23D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a p< 0,05 (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

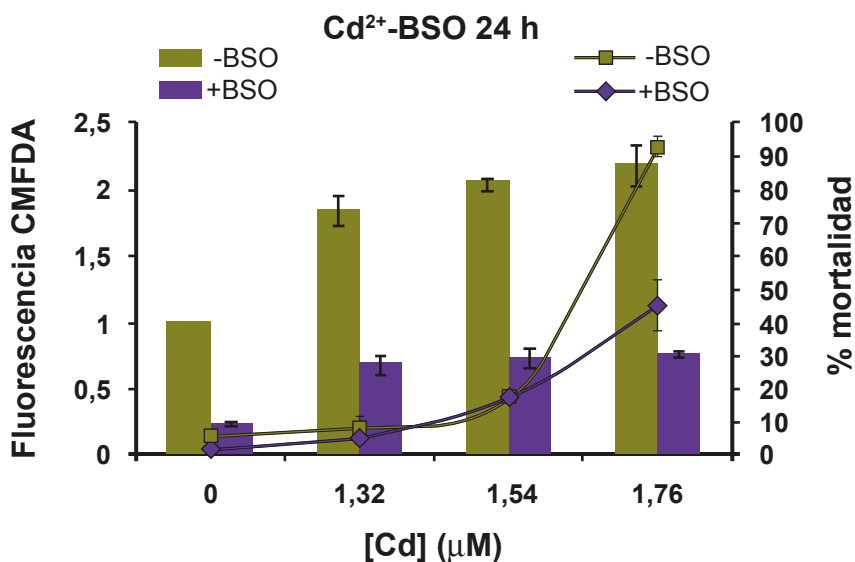


Tabla F24A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

[Cd ²⁺] (μM)	Fluorescencia relativa			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	1	0	0,24	0,00
1,32	1,85	0,11	0,69	0,07
1,54	2,05	0,05	0,74	0,07
1,76	0,16	2,24	0,76	0,01

Tabla F24B.
Mortalidad (IP).

[Cd ²⁺] (μM)	% mortalidad			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	6,41	2,55	3,01	0,76
1,32	8,79	3,24	5,98	1,34
1,54	19,02	2,07	18,36	0,37
1,76	93,14	2,82	45,89	7,75

Tabla F24C. Estadística CMFDA.

Interacción:	Sí (0,011)		
Efecto de BSO:			
Cd ²⁺ (0): (0,000)	Cd ²⁺ (1,32): (0,000)	Cd ²⁺ (1,54): (0,000)	Cd ²⁺ (1,76): (0,004)
Efecto de Cd ²⁺ :			
BSO (-)	0-1,32: (0,006)	1,32-1,54: (0,025)	1,54-1,76: (0,218)
BSO (+)	0-1,32: (0,027)	1,32-1,54: (0,137)	1,54-1,76: (0,435)

Tabla F24D. Estadística IP.

Interacción:	Sí (0,000)			
Efecto de BSO:				
Cd ²⁺ (0): (0,093)	Cd ²⁺ (1,32): (0,238)	Cd ²⁺ (1,54): (0,614)	Cd ²⁺ (1,76): (0,001)	
Efecto de Cd ²⁺ :				
BSO (-)	0-1,32: (0,283)	1,32-1,54: (0,079)	1,54-1,76: (0,001)	
BSO (+)	0-1,32: (0,069)	1,32-1,54: (0,002)	1,54-1,76: (0,023)	

Figura 24. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 24 h a Cd²⁺, en presencia o ausencia de BSO (butionilsulfoximina). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F24A y F24B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F24C y F24D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a p< 0,05 (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

Resultados

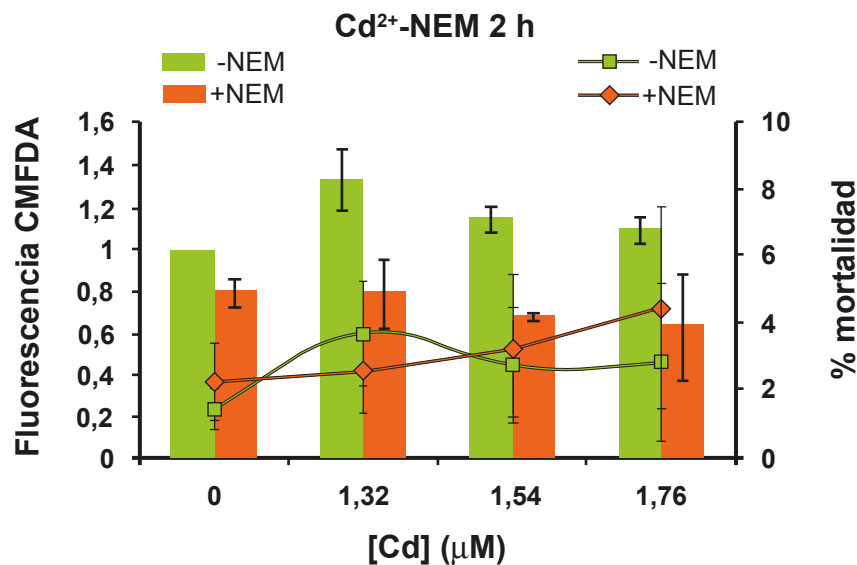


Tabla F25A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

[Cd ²⁺] (μM)	Fluorescencia relativa			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	1	0	0,80	0,07
1,32	1,34	0,15	0,79	0,17
1,54	1,15	0,06	0,68	0,01
1,76	1,10	0,06	0,64	0,25

Tabla F25B.
Mortalidad (IP).

[Cd ²⁺] (μM)	Fluorescencia relativa			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	1,55	0,59	2,37	1,13
1,32	3,79	1,56	2,72	1,31
1,54	2,92	1,65	3,35	2,18
1,76	2,93	2,36	4,55	3,04

Tabla F25C. Estadística CMFDA.

Interacción:	NO (0,178)		
Efecto de NEM:	(0,003)		
Efecto de Cd ²⁺ :	0-1,32: (0,074)	1,32-1,54: (0,034)	1,54-1,76: (0,712)

Tabla F25D. Estadística IP.

Interacción:	NO (0,587)		
Efecto de NEM:	(0,559)		
Efecto de Cd ²⁺ :	0-1,32: (0,124)	1,32-1,54: (0,838)	1,54-1,76: (0,712)

Figura 25. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 2 h a Cd²⁺, en presencia o ausencia de NEM (N-etilmaleimida). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F25A y F25B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F25C y F25D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a p< 0,05 (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

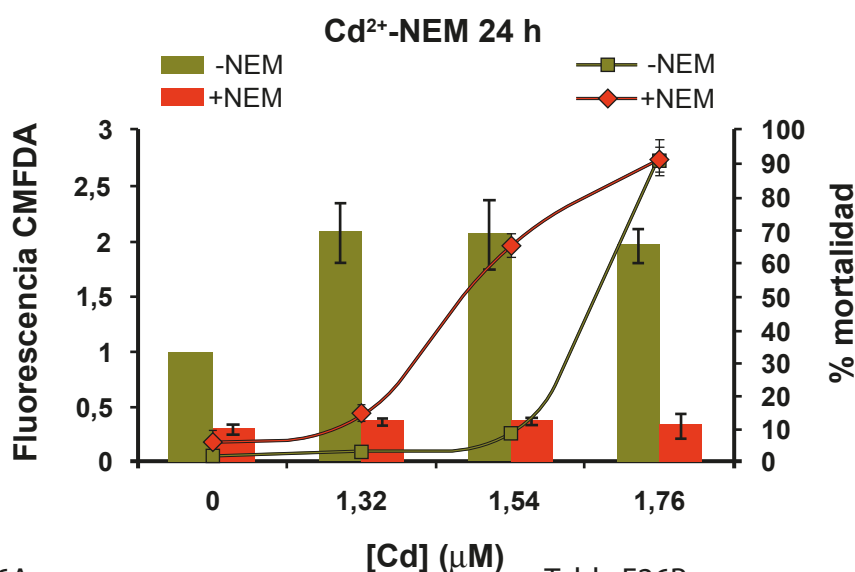


Tabla F26A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

[Cd ²⁺] (μM)	Fluorescencia relativa			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	1	0	0,30	0,05
1,32	2,08	0,27	0,38	0,01
1,54	2,07	0,32	0,39	0,02
1,76	1,97	0,15	0,34	0,12

Tabla F26B.
Mortalidad (IP).

[Cd ²⁺] (μM)	% mortalidad			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	3,75	1,46	6,97	3,53
1,32	4,05	1,63	15,57	1,96
1,54	10,10	3,12	65,87	3,76
1,76	91,54	3,56	92,05	5,57

Tabla F26C. Estadística CMFDA.

Interacción:	Sí (0,000)			
Efecto de NEM:				
Cd ²⁺ (0):	(0,000)	Cd ²⁺ (1,32):	(0,000)	Cd ²⁺ (1,54): (0,000) Cd ²⁺ (1,76): (0,001)
Efecto de Cd²⁺:				
NEM (-)	0-1,32: (0,001)	1,32-1,54: (0,864)	1,54-1,76: (0,191)	
NEM (+)	0-1,32: (0,030)	1,32-1,54: (0,329)	1,54-1,76: (0,353)	

Tabla F26D. Estadística IP.

Interacción:	Sí (0,000)			
Efecto de NEM:				
Cd ²⁺ (0):	(0,215)	Cd ²⁺ (1,32): (0,001)	Cd ²⁺ (1,54): (0,000)	Cd ²⁺ (1,76): (0,900)
Efecto de Cd²⁺:				
NEM (-)	0-1,32: (0,849)	1,32-1,54: (0,086)	1,54-1,76: (0,001)	
NEM (+)	0-1,32: (0,113)	1,32-1,54: (0,001)	1,54-1,76: (0,039)	

Figura 26. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 24 h a Cd²⁺, en presencia o ausencia de NEM (N-etilmaleimida). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F26A y F26B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F26C y F26D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a p < 0,05 (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo-I.

Resultados

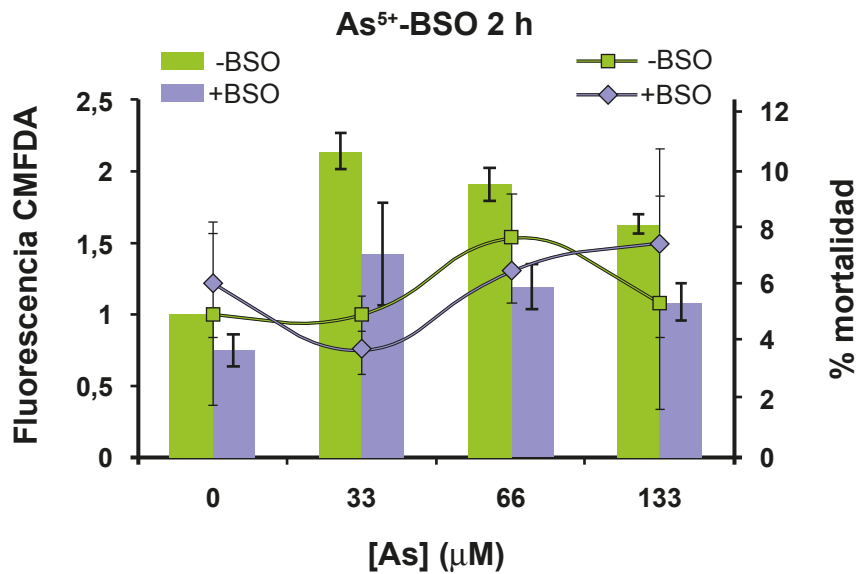


Tabla F27A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

[As ⁵⁺] (μM)	Fluorescencia relativa			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	1	0	0,75	0,11
33	2,14	0,13	1,42	0,36
66	1,91	0,12	1,19	0,16
133	1,63	0,07	1,09	0,13

Tabla F27B.
Mortalidad (IP).

[As ⁵⁺] (μM)	% mortalidad			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	4,96	3,21	5,97	1,81
33	4,97	0,62	3,8	0,95
66	7,69	1,45	6,52	1,14
133	5,36	3,73	7,43	3,33

Tabla F27C. Estadística CMFDA.

Interacción:	Sí (0,040)		
Efecto de BSO:			
As ⁵⁺ (0): (0,019)	As ⁵⁺ (33): (0,039)	As ⁵⁺ (66): (0,004)	As ⁵⁺ (133): (0,003)
Efecto de As ⁵⁺ :			
BSO (-)	0-33: (0,004)	33-66: (0,001)	66-133: (0,010)
BSO (+)	0-33: (0,043)	33-66: (0,173)	66-133: (0,024)

Tabla F27D. Estadística IP.

Interacción:	NO (0,506)		
Efecto de BSO:	(0,838)		
Efecto de As ⁵⁺ :	0-33: (0,366)	33-66: (0,009)	66-133: (0,726)

Figura 27. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 2 h a As⁵⁺, en presencia o ausencia de BSO (butionilsulfoximina). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F27A y F27B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F27C y F27D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a p< 0,05 (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

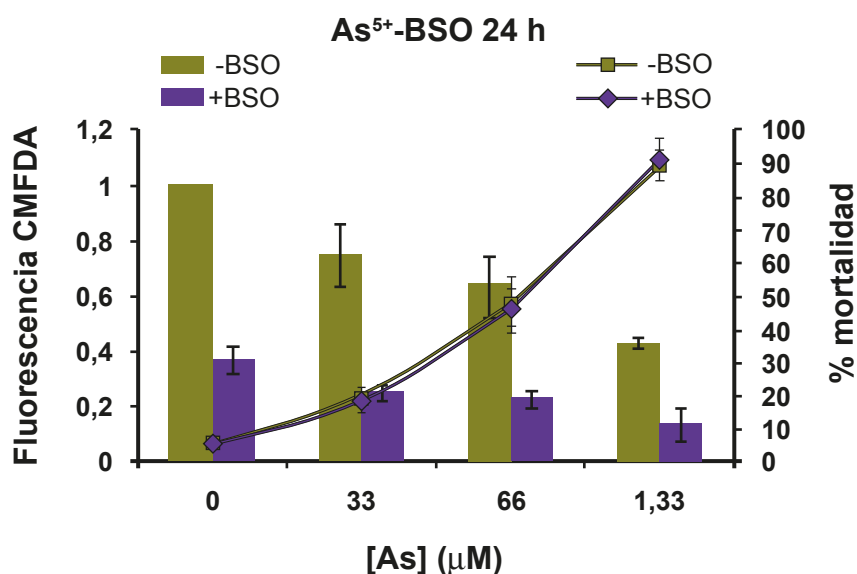


Tabla F28A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

[As ⁵⁺] (μM)	Fluorescencia relativa			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	1	0	0,37	0,05
33	0,75	0,11	0,25	0,03
66	0,64	0,11	0,23	0,03
133	0,43	0,02	0,14	0,06

Tabla F28B.
Mortalidad (IP).

[As ⁵⁺] (μM)	% mortalidad			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	6,3	1,17	5,65	1,32
33	19,19	2,81	19,17	3,82
66	47,92	8,30	46,87	5,70
133	89,90	4,62	91,82	6,48

Tabla F28C. Estadística CMFDA.

Interacción:	Sí (0,011)			
Efecto de BSO:				
As ⁵⁺ (0): (0,000)	As ⁵⁺ (33): (0,002)	As ⁵⁺ (66): (0,003)	As ⁵⁺ (133): (0,001)	
Efecto de As ⁵⁺ :				
BSO (-)	0-33: (0,047)	33-66: (0,001)	66-133: (0,122)	
BSO (+)	0-33: (0,073)	33-66: (0,020)	66-133: (0,279)	

Tabla F28D. Estadística IP.

Interacción:	NO (0,888)			
Efecto de BSO:	(0,797)			
Efecto de As⁵⁺:	0-33: (0,002)	33-66: (0,001)	66-133: (0,000)	

Figura 28. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 24 h a As⁵⁺, en presencia o ausencia de BSO (butionilsulfoximina). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F28A y F28B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F28C y F28D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a $p < 0,05$ (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

Resultados

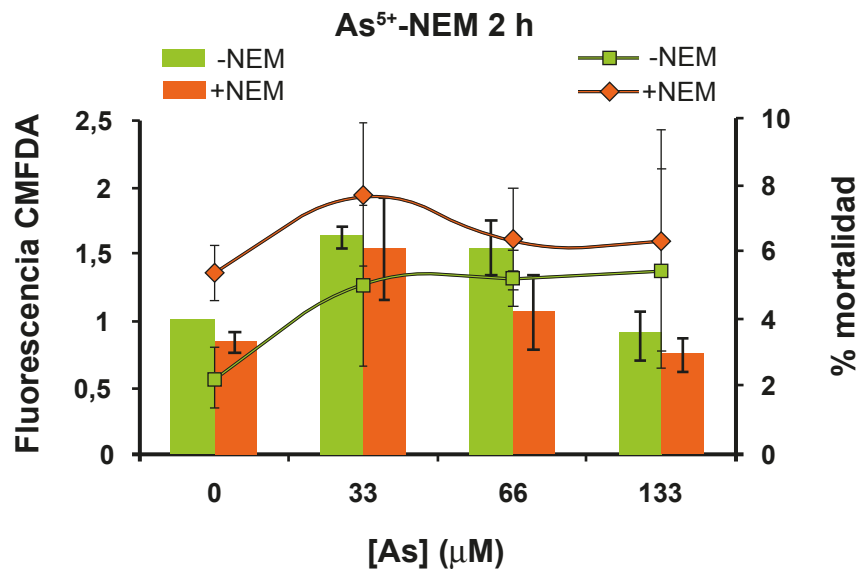


Tabla F29A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

[As ⁵⁺] (μM)	Fluorescencia relativa			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	1	0	0,84	0,08
33	1,64	0,08	1,54	0,38
66	1,54	0,22	1,07	0,27
133	0,90	0,19	0,75	0,13

Tabla F29B.
Mortalidad (IP).

[As ⁵⁺] (μM)	% mortalidad			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	2,32	0,94	5,46	0,77
33	5,13	2,47	7,86	2,21
66	5,34	0,86	6,51	1,52
133	5,59	2,99	6,43	3,34

Tabla F29C. Estadística CMFDA.

Interacción:	NO (0,418)		
Efecto de NEM:	(0,040)		
Efecto de As ⁵⁺ :	0-33: (0,002)	33-66: (0,006)	66-133: (0,099)

Tabla F29D. Estadística IP.

Interacción:	NO (0,668)		
Efecto de NEM:	(0,097)		
Efecto de As ⁵⁺ :	0-33: (0,105)	33-66: (0,655)	66-133: (0,940)

Figura 29. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 2 h a As⁵⁺, en presencia o ausencia de NEM (N-etilmaleimida). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F29A y F29B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F29C y F29D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a p< 0,05 (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

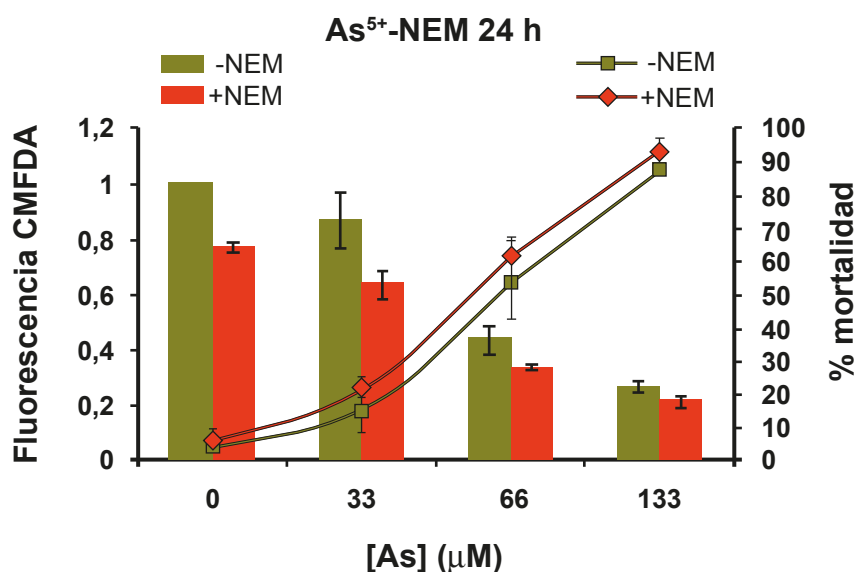


Tabla F30A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

[As ⁵⁺] (μM)	Fluorescencia relativa			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	1	0	0,77	0,02
33	0,87	0,10	0,64	0,05
66	0,44	0,05	0,34	0,00
133	0,27	0,02	0,22	0,02

Tabla F30B.
Mortalidad (IP).

[As ⁵⁺] (μM)	% mortalidad			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	5,26	2,12	7,49	2,19
33	15,66	6,46	22,43	2,85
66	54,47	12,02	61,58	5,87
133	88,73	2,17	93,21	4,64

Tabla F30C. Estadística CMFDA.

Interacción:	Sí (0,027)		
Efecto de NEM:			
As ⁵⁺ (0): (0,000)	As ⁵⁺ (33): (0,034)	As ⁵⁺ (66): (0,055)	As ⁵⁺ (133): (0,025)
Efecto de As ⁵⁺ :			
NEM (-)	0-33: (0,148)	33-66: (0,004)	66-133: (0,020)
NEM (+)	0-33: (0,034)	33-66: (0,009)	66-133: (0,002)

Tabla F30D. Estadística IP.

Interacción:	NO (0,692)		
Efecto de NEM:	(0,060)		
Efecto de As ⁵⁺ :	0-33: (0,002)	33-66: (0,001)	66-133: (0,002)

Figura 30. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 24 h a As⁵⁺, en presencia o ausencia de NEM (N-etilmaleimida). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F30A y F30B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F30C y F30D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a $p < 0,05$ (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

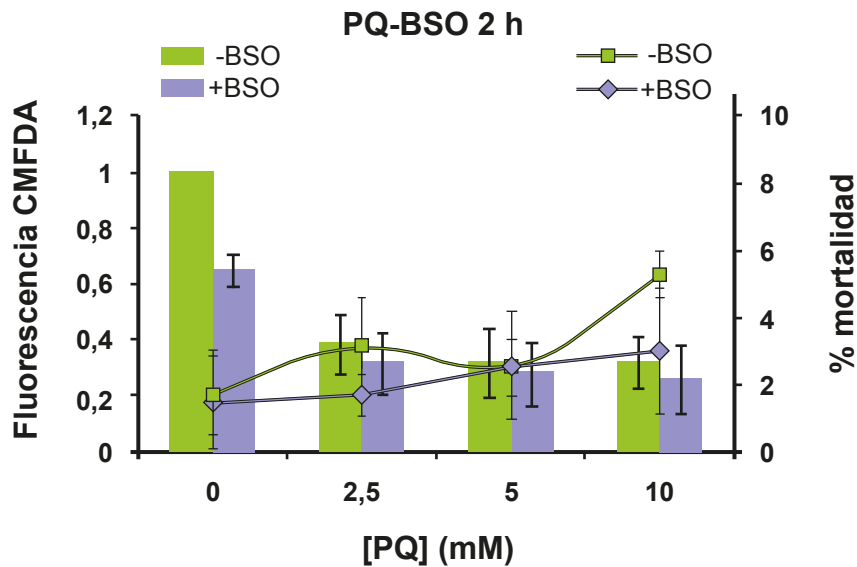


Tabla F31A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

[PQ] (mM)	Fluorescencia relativa			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	1	0	0,65	0,06
2,5	0,39	0,11	0,32	0,11
5	0,32	0,12	0,28	0,11
10	0,32	0,09	0,26	0,12

Tabla F31B.
Mortalidad (IP).

[PQ] (mM)	% mortalidad			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	1,68	1,2	1,57	1,50
2,5	3,18	1,5	1,72	0,63
5	2,57	0,83	2,60	1,58
10	5,32	0,69	3,07	1,90

Tabla F31C. Estadística CMFDA.

Interacción:	Sí (0,016)		
Efecto de BSO:			
PQ(0): (0,011)	PQ(2,5): (0,510)	PQ(5): (0,618)	PQ(10): (0,585)
Efecto de PQ:			
BSO (-)	0-2,5: (0,013)	2,5-5: (0,011)	5-10: (0,525)
BSO (+)	0-2,5: (0,012)	2,5-5: (0,020)	5-10: (0,199)

Tabla F31D. Estadística IP.

Interacción:	NO (0,320)		
Efecto de BSO:	(0,225)		
Efecto de PQ:	0-2,5: (0,179)	2,5-5: (0,822)	5-10: (0,000)

Figura 31. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 2 h a PQ, en presencia o ausencia de BSO (butionilsulfoximina). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F31A y F31B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F31C y F31D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a $p < 0,05$ (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

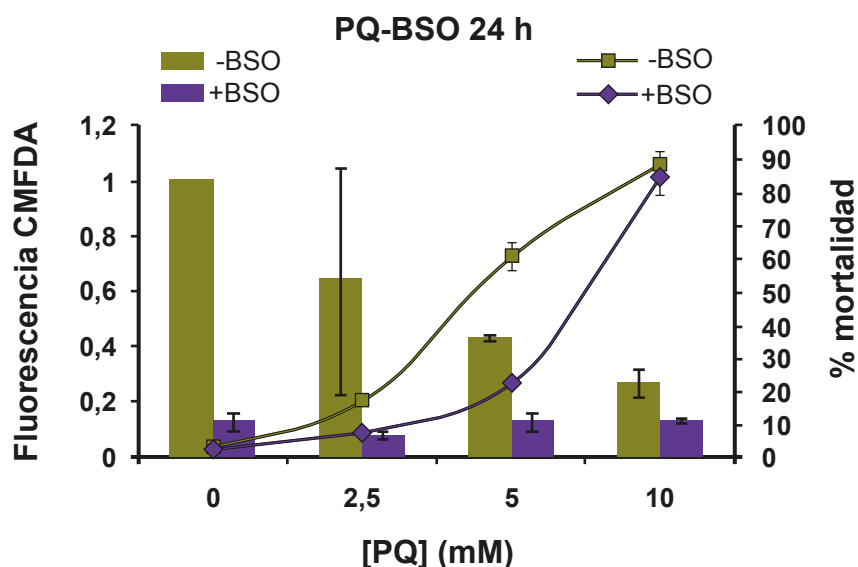


Tabla F32A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

[PQ] (mM)	Fluorescencia relativa			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	1	0	0,13	0,03
2,5	0,64	0,41	0,08	0,01
5	0,43	0,00	0,13	0,03
10	0,27	0,05	0,13	0,00

Tabla F32B.
Mortalidad (IP).

[PQ] (mM)	% mortalidad			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	2,31	0,86	2,14	0,71
2,5	16,02	2,2	6,93	0,54
5	56,51	3,98	20,78	0,69
10	82,04	4,07	79,04	5,17

Tabla F32C. Estadística CMFDA.

Interacción:	Sí (0,043)		
Efecto de BSO:			
PQ(0): (0,000)	PQ(2,5): (0,093)	PQ(5): (0,003)	PQ(10): (0,035)
Efecto de PQ:			
BSO (-)	0-2,5: (0,505)	2,5-5: (0,257)	5-10: (0,044)
BSO (+)	0-2,5: (0,073)	2,5-5: (0,120)	5-10: (0,547)

Tabla F32D. Estadística IP.

Interacción:	Sí (0,001)		
Efecto de BSO:			
PQ(0): (0,809)	PQ(2,5): (0,002)	PQ(5): (0,000)	PQ(10): (0,473)
Efecto de PQ:			
BSO (-)	0-2,5: (0,005)	2,5-5: (0,006)	5-10: (0,018)
BSO (+)	0-2,5: (0,010)	2,5-5: (0,000)	5-10: (0,003)

Figura 32. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 24 h a PQ, en presencia o ausencia de BSO (butionilsulfoximina). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F32A y F32B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F32C y F32D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a $p < 0.05$ (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

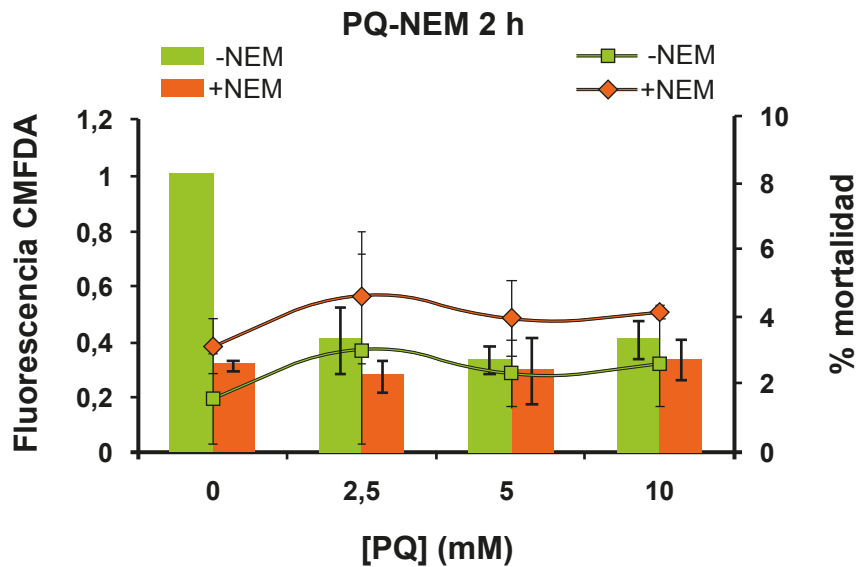


Tabla F33A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

[PQ] (mM)	Fluorescencia relativa			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	1	0	0,32	0,02
2,5	0,41	0,12	0,28	0,06
5	0,34	0,05	0,30	0,12
10	0,41	0,07	0,34	0,07

Tabla F33B.
Mortalidad (IP).

[PQ] (mM)	% mortalidad			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	1,70	1,36	3,24	0,81
2,5	3,17	2,87	4,73	1,98
5	2,47	1,00	4,09	1,13
10	2,79	1,35	4,25	0,20

Tabla F33C. Estadística CMFDA.

Interacción:	Sí (0,003)		
Efecto de NEM:			
PQ(0): (0,015)	PQ(2,5): (0,413)	PQ(5): (0,574)	PQ(10): (0,693)
Efecto de PQ:			
NEM (-)	0-2,5: (0,032)	2,5-5: (0,452)	5-10: (0,423)
NEM (+)	0-2,5: (0,456)	2,5-5: (0,102)	5-10: (0,089)

Tabla F33D. Estadística IP.

Interacción:	NO (0,652)		
Efecto de NEM:	(0,568)		
Efecto de PQ:	0-2,5: (0,302)	2,5-5: (0,837)	5-10: (0,480)

Figura 33. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 2 h a PQ, en presencia o ausencia de NEM (N-etilmaleimida). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F33A y F33B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F33C y F33D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a $p < 0,05$ (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

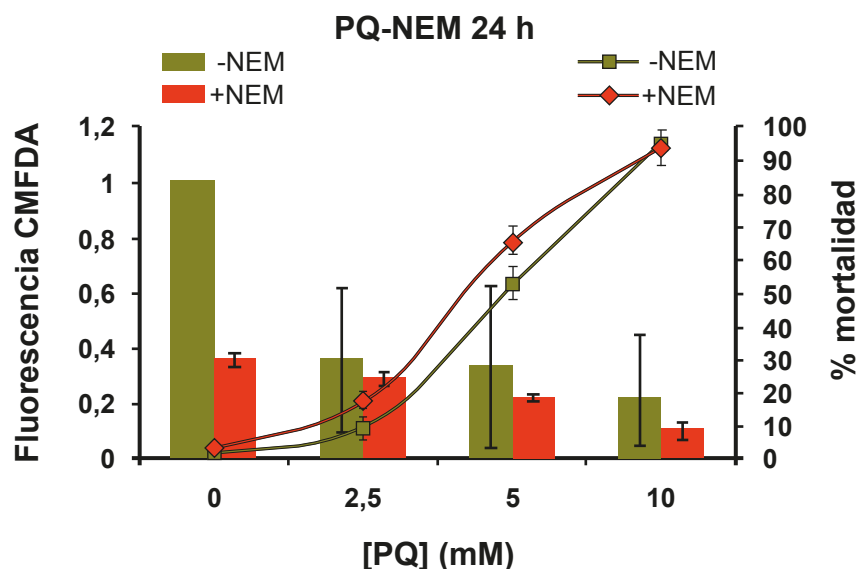


Tabla F34A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

[PQ] (mM)	Fluorescencia relativa			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	1	0	0,36	0,02
2,5	0,36	0,26	0,29	0,02
5	0,34	0,29	0,22	0,01
10	0,25	0,20	0,11	0,03

Tabla F34B.
Mortalidad (IP).

[PQ] (mM)	% mortalidad			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	2,8	1,54	3,39	1,6
2,5	9,63	3,21	17,86	2,23
5	53,15	5,03	66,40	4,61
10	95,03	6,56	94,03	5,29

Tabla F34C. Estadística CMFDA.

Interacción:	Sí (0,032)		
Efecto de NEM:			
PQ(0): (0,000)	PQ(2,5): (0,438)	PQ(5): (0,336)	PQ(10): (0,182)
Efecto de PQ:			
NEM (-)	0-2,5: (0,057)	2,5-5: (0,678)	5-10: (0,173)
NEM (+)	0-2,5: (0,000)	2,5-5: (0,002)	5-10: (0,006)

Tabla F34D. Estadística IP.

Interacción:	NO (0,112)		
Efecto de NEM:	(0,005)		
Efecto de PQ:	0-2,5: (0,003)	2,5-5: (0,000)	5-10: (0,001)

Figura 34. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 24 h a PQ, en presencia o ausencia de NEM (N-etilmaleimida). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F34A y F34B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F34C y F34D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a $p < 0,05$ (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

Resultados

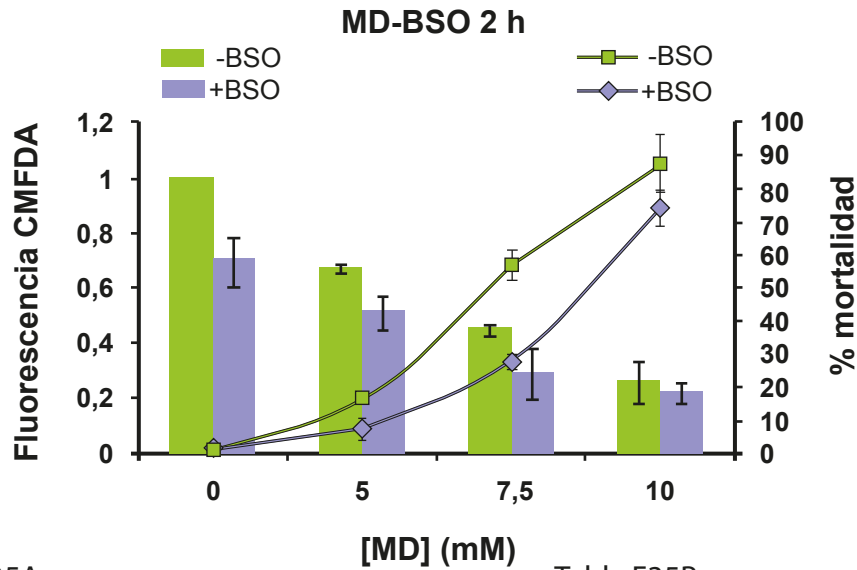


Tabla F35A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

[MD] (mM)	Fluorescencia relativa			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	1	0	0,70	0,09
5	0,67	0,01	0,51	0,06
7,5	0,45	0,02	0,29	0,09
10	0,26	0,08	0,22	0,04

Tabla F35B.
Mortalidad (IP).

[MD] (mM)	% mortalidad			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	1,65	0,50	2,23	0,99
5	17,67	0,83	7,63	2,88
7,5	57,35	4,74	28,04	1,76
10	88,31	8,73	74,90	5,42

Tabla F35C. Estadística CMFDA.

Interacción:	Sí (0,017)		
Efecto de BSO:			
MD(0): (0,004)	MD(5): (0,006)	MD(7,5): (0,045)	MD(10): (0,482)
Efecto de MD:			
BSO (-)	0-5: (0,001)	5-7,5: (0,008)	7,5-10: (0,081)
BSO (+)	0-5: (0,014)	5-7,5: (0,012)	7,5-10: (0,119)

Tabla F35D. Estadística IP.

Interacción:	Sí (0,004)		
Efecto de BSO:			
MD(0): (0,414)	MD(5): (0,004)	MD(7,5): (0,001)	MD(10): (0,087)
Efecto de MD:			
BSO (-)	0-5: (0,002)	5-7,5: (0,004)	7,5-10: (0,022)
BSO (+)	0-5: (0,042)	5-7,5: (0,006)	7,5-10: (0,119)

Figura 35. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 2 h a MD, en presencia o ausencia de BSO (butionilsulfoximina). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F35A y F35B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F35C y F35D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a $p < 0,05$ (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

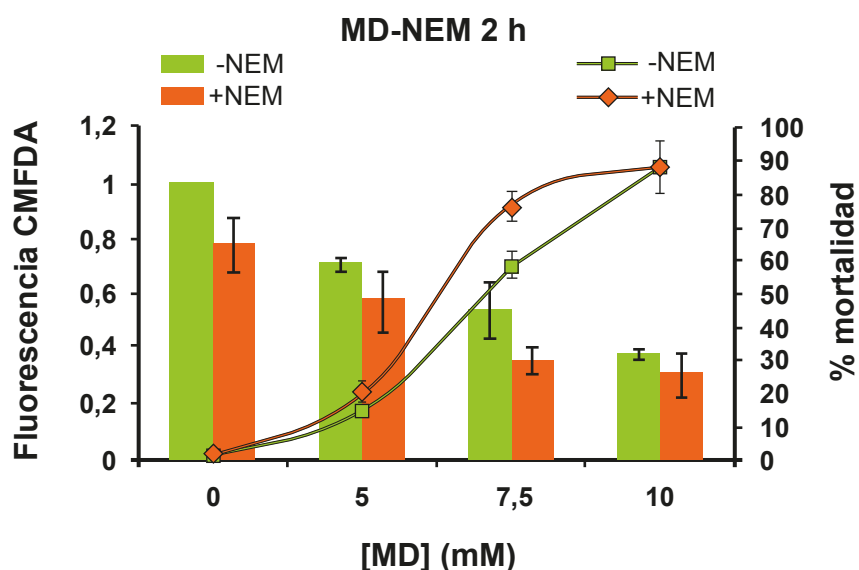


Tabla F36A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

[MD] (mM)	Fluorescencia relativa			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	1	0	0,78	0,10
5	0,71	0,02	0,58	0,11
7,5	0,54	0,10	0,36	0,05
10	0,38	0,02	0,31	0,08

Tabla F36B.
Mortalidad (IP).

[MD] (mM)	% mortalidad			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	1,36	1,00	2,03	1,27
5	15,41	2,81	20,79	3,05
7,5	58,90	4,00	76,67	4,12
10	89,12	8,37	88,64	8,31

Tabla F36C. Estadística CMFDA.

Interacción:	NO (0,091)		
Efecto de NEM:	(0,052)		
Efecto de MD:	0-5: (0,000)	5-7,5: (0,002)	7,5-10: (0,009)

Tabla F36D. Estadística IP.

Interacción:	NO (0,079)		
Efecto de NEM:	(0,025)		
Efecto de MD:	0-5: (0,000)	5-7,5: (0,000)	7,5-10: (0,087)

Figura 36. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 2 h a MD, en presencia o ausencia de NEM (N-etilmaleimida). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F36A y F36B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F36C y F36D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a $p < 0,05$ (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

Resultados

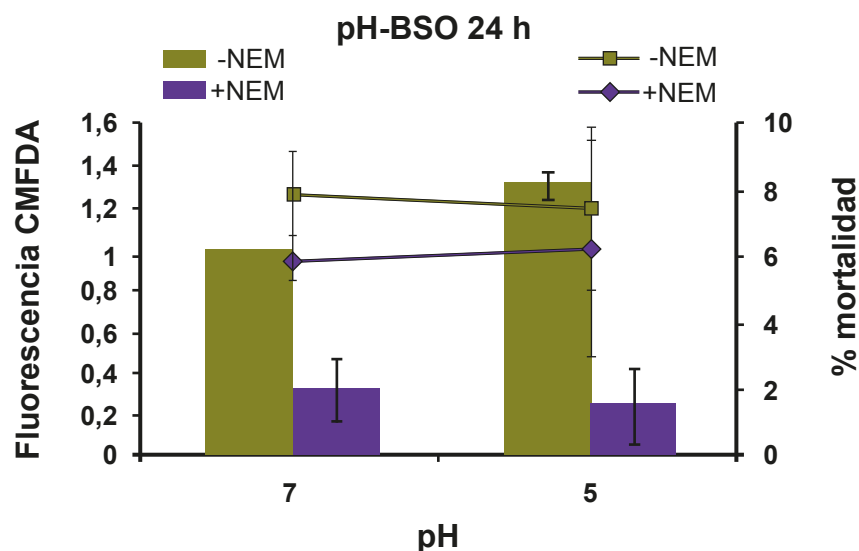


Tabla F37A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

pH	Fluorescencia relativa			
	- BSO		+ BSO	
	m	s	m	s
7	1	0	0,33	0,15
5	1,31	0,07	0,25	0,19

Tabla F37B.
Mortalidad (IP).

pH	% mortalidad			
	- BSO		+ BSO	
	m	s	m	s
7	7,97	1,26	6,00	0,66
5	7,53	2,50	6,3	3,26

Tabla F37C. Estadística CMFDA.

Interacción:	SÍ (0,003)
Efecto de BSO:	
pH7: (0,021)	pH5: (0,002)
Efecto de pH:	
BSO (-)	pH7-pH5: (0,031)
BSO (+)	pH7-pH5: (0,095)

Tabla F37D. Estadística IP.

Interacción:	NO (0,768)
Efecto de BSO:	(0,299)
Efecto de pH:	pH7-pH5 (0,957)

Figura 37. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 24 h a un medio con pH 5, en presencia o ausencia de BSO (butionilsulfoximina). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F37A y F37B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F37C y F37D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a $p < 0,05$ (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

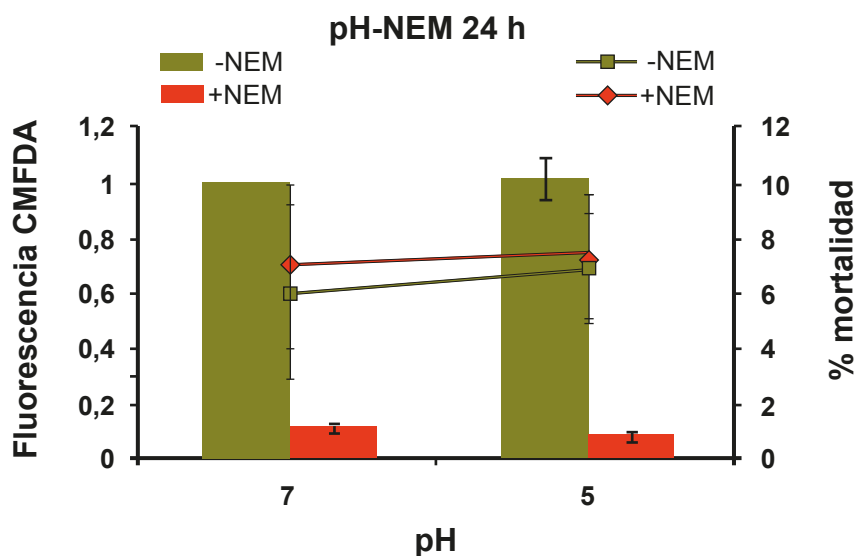


Tabla F38A.
Grupos tiólicos (CMFDA).

pH	Fluorescencia relativa			
	- NEM		+ NEM	
	m	s	m	s
7	1	0	0,12	0,01
5	1,02	0,07	0,09	0,02

Tabla F38B.
Mortalidad (IP).

pH	% mortalidad			
	- NEM		+ NEM	
	m	s	m	s
7	6,13	3,12	7,07	2,97
5	7,00	1,93	7,37	2,16

Tabla F38C. Estadística CMFDA.

Interacción:	SÍ (0,025)
Efecto de NEM:	
pH7: (0,000)	pH5: (0,000)
Efecto de pH:	
NEM (-)	pH7-pH5: (0,092)
NEM (+)	pH7-pH5: (0,209)

Tabla F38D. Estadística IP.

Interacción:	NO (0,583)
Efecto de NEM:	(0,767)
Efecto de pH:	pH7-pH5 (0,289)

Figura 38. El histograma muestra la determinación de grupos tiólicos mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo CMFDA, en poblaciones expuestas durante 24 h a un medio con pH 5, en presencia o ausencia de NEM (N-etilmaleimida). En el eje izquierdo de la gráfica se representa la fluorescencia relativa debida al CMFDA, y en el eje derecho el porcentaje de mortalidad celular (líneas). En las dos primeras tablas (F38A y F38B) se recogen los valores representados en la doble gráfica, m: valores medios de fluorescencia relativa o mortalidad; ds: desviación estándar. Las dos tablas siguientes (F38C y F38D) contienen el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambos parámetros. Valores significativos a $p < 0,05$ (sombreados). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

Resultados

En el caso del Cd^{2+} (Figuras 23-26), las exposiciones a tiempos cortos (2 h), causan una mortalidad prácticamente nula para todas las concentraciones ensayadas de este metal (Figuras 23 y 25); sin embargo, en los tratamientos más prolongados (24 h) (Figuras 24 y 26), el porcentaje de mortalidad se incrementa notablemente a concentraciones metálicas comprendidas entre 1,54 y 1,76 μM , de manera que, a esta última concentración la mortalidad celular afecta casi al 100 % de la población (sin BSO y con/sin NEM), mientras que a esta misma concentración de Cd^{2+} (1,76 μM) y tratamiento con BSO (Figura 24) la mortalidad es del 50 %. Este efecto citotóxico del Cd^{2+} es bastante diferente en presencia de cualquiera de los productos que afecta la capacidad celular antioxidante, BSO o NEM, cuando las células son expuestas al metal durante 24 h. La existencia de BSO en el medio, disminuye la mortalidad de los cultivos de forma significativa, casi a la mitad (50 %) (Figura 24) a la concentración de Cd^{2+} más elevada. Por el contrario, en presencia de NEM (Figura 26), se produce un incremento drástico en el porcentaje de células muertas (un 70 %) a 1,54 μM de Cd^{2+} , respecto de la población con Cd^{2+} pero sin NEM. A una concentración de Cd^{2+} superior (1,76 μM) ambas poblaciones (con o sin NEM) presentan una mortalidad del 100 %.

La presencia de Cd^{2+} , también causa importantes variaciones en los niveles celulares de antioxidantes con grupos tiólicos (Figuras 23-26). Independientemente del tiempo de exposición al metal (2 ó 24 h), los tratamientos con Cd^{2+} causan un incremento de fluorescencia, que correspondería a un aumento de los niveles intracelulares de antioxidantes con grupos tiólicos (GSH y metalotioneínas, principalmente). Como se esperaba, en presencia de BSO o NEM, la emisión de fluorescencia disminuye de forma significativa, esta diferencia es más acusada en poblaciones tratadas durante 24 h (Figuras 24 y 26), lo que significa un descenso en la concentración celular de GSH u otros antioxidantes con grupos tiólicos. En las exposiciones a diferentes concentraciones de Cd^{2+} , los patrones de los niveles de moléculas con grupos tiólicos a diferentes concentraciones de Cd^{2+} (los tratados durante 2 h) (Figuras 23 y 25) son, en general similares, independientemente de si han sufrido tratamiento con BSO o NEM, y algo similar ocurre con los patrones a 24 h de tratamiento con Cd^{2+} (Figuras 24 y 26). En los patrones de 2 h (Figuras 23 y 25), el máximo valor obtenido de fluorescencia está en los tratados con 1,32 μM de Cd^{2+} , independientemente de si han sido tratados con BSO o NEM. A concentraciones superiores disminuyen tanto los controles como los tratados con BSO o NEM (aunque en algunos casos no hay diferencia significativa respecto de la muestra con la concentración de Cd^{2+} más baja). En los patrones de 24 h (tratamiento de Cd^{2+}), los valores de fluorescencia van aumentando con la concentración de metal o se mantienen similares respecto de los obtenidos en la concentración más baja (Figuras 24 y 26). Igualmente, el BSO o NEM disminuyen drásticamente los niveles de fluorescencia de estas muestras.

El As^{5+} (arseniato) presenta en *T. thermophila* un efecto citotóxico algo diferente respecto al observado para el Cd^{2+} (Figuras 27-30). En este caso, y al igual que el Cd^{2+} , la mortalidad celular tras 2 h de tratamiento con As^{5+} fue prácticamente nula, tanto en presencia o ausencia de BSO o NEM (Figuras 27 y 29). Un incremento del tiempo de exposición al metal de hasta 24 h causa variaciones importantes en la mortalidad de los cultivos, de manera que el incremento de la citotoxicidad celular guarda una relación directamente proporcional con la concentración de As^{5+} (Figuras 28 y 30), alcanzando una mortalidad de casi un 100 % a una concentración 133 μM de As^{5+} (24 h). Y esto ocurre tanto en presencia o ausencia de BSO o NEM.

En cuanto a la cantidad de grupos tiólicos libres, en presencia de arseniato se obtienen resultados algo diferentes a los detectados en las muestras expuestas a cadmio (Figuras 27-30). En tratamientos cortos (2 h) y a la concentración más baja (33 μM) de metal, se produce un evidente incremento en la concentración intracelular de grupos tiólicos (casi el doble con respecto del control sin metal) (Figuras 27 y 29). Al aumentar la concentración de metal, los niveles intracelulares de tioles libres van disminuyendo, y esto ocurre tanto en muestras tratadas con BSO o NEM como las no tratadas. Las muestras tratadas con As^{5+} -NEM (2 h) muestran una disminución de la concentración de grupos tiólicos libres menor (una diferencia media de 0,24) (Figura 29), que aquellas disminuciones que presentan las muestras tratadas con Cd^{2+} -NEM (2 h) (una diferencia media de 0,49) (Figura 25). Tratamientos más prolongados (24 h) (Figuras 28 y 30), muestran un patrón similar tras tratamiento con As^{5+} ; una disminución paulatina de la cantidad de grupos tiólicos libres a medida que se incrementa la concentración de As^{5+} , inversamente correlacionada con el incremento de mortalidad, y esto ocurre de forma similar tanto en las muestras tratadas con BSO o NEM como en las no expuestas con estos inhibidores. La disminución de los niveles de grupos tiólicos de muestras tratadas con BSO respecto de las no tratadas es mayor (una diferencia media de 0,4) (Figura 28), que la disminución detectada (una diferencia media de 0,12) en muestras tratadas con NEM respecto del control no tratado (Figura 30).

El paraquat (PQ) es un herbicida, con capacidad de inducir estrés oxidativo, que tiene escaso efecto tóxico sobre *T. thermophila*, cuando las exposiciones celulares son muy cortas (2 h) (Figuras 31 y 33). Sin embargo, la citotoxicidad del PQ aumenta notablemente cuando los tratamientos tienen una duración mayor (24 h) (Figuras 32 y 34). El porcentaje de mortalidad es superior en aquellas poblaciones celulares sometidas a una inhibición de la biosíntesis de GSH por la presencia de BSO (a una concentración de PQ de 5 mM) (Figura 32), con respecto a los cultivos sin BSO. Sin embargo, la alteración de compuestos tiólicos con NEM no causa variaciones importantes de mortalidad celular, con respecto a la detectada en poblaciones no sometidas

Resultados

das a NEM (Figura 34). En todas las exposiciones a PQ, independientemente de la concentración utilizada y el tiempo de exposición (2 ó 24 h), la presencia de este agente produjo un descenso drástico en los niveles celulares de grupos tiólicos, siempre inferiores a los de la población control (sin PQ) (Figuras 33-34). El paraquat causa una disminución tan elevada de tioles celulares libres que su presencia interfiere con los inhibidores o agentes bloqueantes de tioles utilizados (BSO y NEM). Sin embargo, los tratados con BSO o NEM presentan unos valores ligeramente inferiores a aquellos que se observan en las muestras no tratadas (Figuras 33-34).

Si lo comparamos con lo que ocurre en otros microorganismos u organismos pluricelulares, el oxidante menadiona (MD) (Figuras 35 y 36) es un compuesto muy tóxico para el ciliado *T. thermophila*, lo que resulta bastante sorprendente. Cuando los periodos de tratamiento fueron largos (24 h), se produjo la mortalidad de toda la población, a todas las concentraciones ensayadas, incluidas las muy bajas (datos no mostrados). Por esta razón, en el caso de la MD, todos los experimentos se realizaron exponiendo a las células tan sólo durante 2 h (Figuras 35 y 36). Los resultados indican una relación directamente proporcional entre la mortalidad celular y la concentración de MD, de manera que en presencia de una concentración 10 mM de este compuesto, la mayoría (80-90 %) de las células de la población no son viables (Figuras 35 y 36). El efecto de la inhibición de la biosíntesis de GSH (tratados con BSO) (Figura 35), causa una disminución de la citotoxicidad de la MD, especialmente a concentraciones bajas o moderadas (5 y 7,5 mM) de MD. Por el contrario, tratamientos con NEM siempre produjeron un ligero incremento de la mortalidad celular a las mismas concentraciones moderadas de MD (Figura 36). Por otro lado, tanto el NEM como el BSO reducen los niveles de grupos tiólicos libres en todas las concentraciones de MD ensayadas, de una manera similar (una diferencia media de 0,12 para ambos). Esta diferencia media (0,12) es menor respecto de los no tratados con MD (0,26 de media).

El descenso del pH hasta un valor de 5 no produce un incremento significativo de mortalidad en los cultivos de *Tetrahymena*, con independencia de si las células están o no en presencia de los inhibidores BSO o NEM (Figuras 37 y 38). En presencia de BSO o NEM, e independientemente del pH ácido o neutro, existe una disminución significativa de los grupos tiólicos libres, respecto de los no tratados con BSO o NEM.

2. RELEVANCIA DEL GLUTATIÓN EN LA RESPUESTA A ESTRÉS FRENTE A METALES PESADOS Y OTROS AGENTES CITOTÓXICOS EN EL CILIADO *T. thermophila*.

Por medio del fluorocromo CMFDA y posterior citometría de flujo, sólo es posible cuantificar grupos tiólicos totales, sin poder diferenciar entre el GSH u otros tipos de moléculas que los presentan. Para evaluar la importancia de este tripéptido en la respuesta celular frente a los metales y agentes oxidantes utilizados, se determinaron los niveles de glutatión, mediante un ensayo enzimático específico, en distintas poblaciones de *T. thermophila* sometidas a los mismos tratamientos que en el apartado anterior. Además, como un control, se valoró la cantidad de GSH en diferentes fases de la curva crecimiento-división de una población de *T. thermophila*, con el fin de conocer las variaciones que se producen a lo largo de la misma. El protocolo utilizado sólo permite valorar la cantidad de glutatión total, es decir, tanto el que se encuentra en forma reducida (GSH), como oxidada (GSSG).

2.1 Variación enzimática de los niveles de glutatión total a lo largo de la curva de crecimiento de una población de *T. thermophila*.

Con objeto de comprobar si se producen variaciones importantes en el contenido total de glutatión, a lo largo del crecimiento de una población del ciliado *Tetrahymena thermophila* (creciendo en condiciones estándar; medio PP210 a 32 °C), se determinaron los niveles totales de esta molécula a lo largo de la curva de crecimiento. Los resultados se muestran en la Figura 39. Del análisis de la curva de crecimiento (fase exponencial) se obtiene un valor de n (número de generaciones) = 2,6 y un tiempo de generación de 4,6 h, con un valor de tasa horaria de crecimiento = $0,21 \text{ h}^{-1}$. Como se aprecia en la Figura 39, los niveles de glutatión totales (expresado como $\text{nmoles}/10^6 \text{ células}$), se mantienen constantes (en torno a 3 nmoles) durante toda la fase de latencia, y se duplica durante la fase exponencial (18 h) alcanzándose el valor máximo cuando acaba esta fase de crecimiento. En la fase estacionaria (unas 18 h después de acabar la fase exponencial) los valores totales de glutatión disminuyen aproximadamente 2 nmoles por debajo del valor máximo alcanzado. Esto indica que los niveles de glutatión se incrementan durante la fase de máxima actividad celular (fase exponencial) y se sextuplica (6x) la población celular. En conclusión, debido a estas variaciones en el contenido basal de glutatión a lo largo del crecimiento poblacional, todos los bioensayos (cultivos control y poblaciones tratadas con diversos agentes) en los que se mida glutatión deberían hacerse utilizando poblaciones celulares que se encuentren aproximadamente en la misma fase de crecimiento.

Resultados

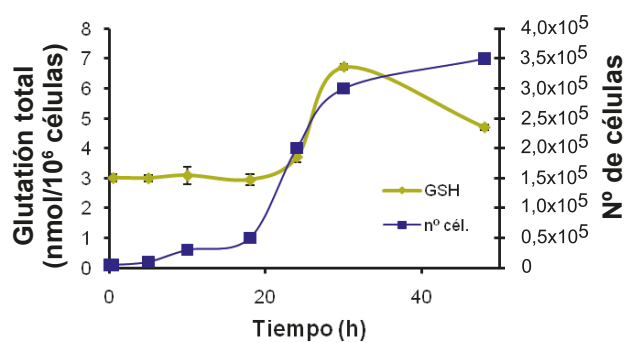


Figura 39. Valoración enzimática de la cantidad de glutatión a lo largo de la curva de crecimiento de una población de *T. thermophila*. En color verde se representa la cantidad total de GSH determinada para 10^6 células y en color azul el número de células que alcanza la población en función del tiempo de cultivo.

Tiempo (horas)	Glutatión total (nmol)		Número de células
	m	ds	
0	-	-	5×10^3
0,5	3,01	0,13	5×10^3
5	3,00	0,12	1×10^4
10	3,09	0,30	3×10^4
18	2,95	0,19	5×10^4
24	3,71	0,19	2×10^5
30	6,71	0,10	3×10^5
48	4,70	0,09	3×10^5

Tabla 12. Valoración enzimática de la cantidad de glutatión a lo largo de la curva de crecimiento de una población de *T. thermophila*. Se muestran los valores medios (m) ($n=3$) de glutatión en distintos puntos de la curva de crecimiento, su desviación estándar (ds) y la concentración celular estimada por recuento directo. Dichos valores se representan en la Figura 39.

2.2 Valoración enzimática del glutatión en muestras tratadas con metales y agentes oxidantes.

Las poblaciones de *T. thermophila* tratadas, durante 2 h, con distintas concentraciones de Cd^{2+} no mostraron variaciones significativas en el contenido total de glutatión (Figura 40A). La adición del inhibidor de la biosíntesis de glutatión (BSO), a estas muestras expuestas a tratamientos cortos con Cd^{2+} , tampoco causan variaciones apreciables en la cantidad total de este tripéptido, independientemente de la concentración metálica presente en el medio (Figura 40A), aunque sí se detecta una pequeña disminución del glutatión total. Por el contrario, las exposiciones celulares más prolongadas (24 h) a este metal no esencial, inducen un incremento significativo de glutatión, que es más apreciable en el caso de la concentración metálica más elevada (Figura 40B). En estos tratamientos metálicos más prolongados (24 h), el suministro adicional de BSO produce un pequeño descenso significativo en el nivel de glutatión total respecto de los no tratados, salvo a la concentración de cadmio de $1,54 \mu\text{M}$ (Figura 40B). El análisis estadístico señala que existe una interacción entre ambos factores, Cd^{2+} y BSO. Con respecto a los tratamientos con NEM (Figura 41), en exposiciones cortas (2 h), el compuesto NEM también parece actuar como un modulador del efecto celular del Cd^{2+} (Figura 41A). Sin embargo, el análisis estadístico no indica la existencia de interacción entre Cd^{2+} y NEM, cuando la exposición

es más larga (24 h) (Figura 41B). En los experimentos con NEM durante 2 h, en los controles sin tratamiento con NEM (barras verdes en Figura 41A), la muestra tratada con $1,32 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} muestra valores ligeramente superiores respecto del resto. Entre el control y la concentración más baja de metal ($1,32 \mu\text{M}$) existe un incremento significativo de glutatión, pero al aumentar la concentración de metal, se produce también un descenso significativo del tripeptido. En presencia de NEM (Figura 41A), existe una reducción significativa en todos los tratados con Cd^{2+} , respecto de los no tratados con NEM. Por el contrario, en las exposiciones de mayor duración (24 h), se detecta un incremento suave del glutatión total respecto de la concentración de Cd^{2+} (Figura 41B). El NEM disminuye los niveles de glutatión en todos los casos. Por último, hay que destacar que, la reducción de los niveles totales de glutatión, causada por la presencia de NEM (tras 24 h de tratamiento, con un valor medio de 2,77 nmoles), es ligeramente superior al descenso de glutatión, que se produce al inhibir la biosíntesis de este tripeptido con BSO (24 h) (un valor medio de 3,25 nmoles).

En presencia de arseniato (Figura 42), los valores de glutatión total (sin BSO) son muy similares a las diferentes concentraciones de este metaloide, tanto a 2 h (Figura 42A) como a 24 h de tratamiento (Figura 42B). Cuando se adiciona BSO, hay ligeras disminuciones en los niveles de glutatión total respecto de aquellos sin BSO, siendo esa disminución más acentuada en las muestras tratadas durante 2 h (2,7 nmoles como promedio) respecto de las de 24 h de tratamiento (3,6 nmoles como promedio). Por lo que no parece posible establecer una relación entre las variaciones de los niveles de glutatión y el tiempo de exposición metálica. El análisis estadístico revela exclusivamente la existencia de una interacción estadísticamente significativa, entre As^{5+} y BSO, cuando las exposiciones celulares a ambos componentes son cortas (2 h). Sin embargo, en los experimentos con NEM (Figura 43), el tiempo de exposición parece ser un factor a tener en cuenta. Así, se ha detectado un leve incremento en la cantidad total de glutatión en aquellas poblaciones expuestas durante periodos más cortos, y, por el contrario, un descenso de glutatión total, cuando las células permanecían en presencia de ambos compuestos (As^{5+} y NEM) durante periodos más prolongados (24 h). Al igual que en los tratamientos con Cd^{2+} , el efecto de la NEM es superior al del BSO en la reducción de los niveles de GSH.

En todos los casos, el tratamiento con PQ (Figuras 45 y 46) causa ligeras variaciones en la concentración total de glutatión, independientemente del tiempo de exposición y la concentración aplicada de este herbicida. Tanto en el pretratamiento con BSO como con NEM, en las exposiciones más cortas (2 h) existe una interacción significativa entre el BSO o la NEM y el PQ, interacción que no existe en los tiempos de exposición más prolongados (24 h). Cuando además de PQ, el medio contiene el inhibidor BSO, se observa un descenso en los niveles

Resultados

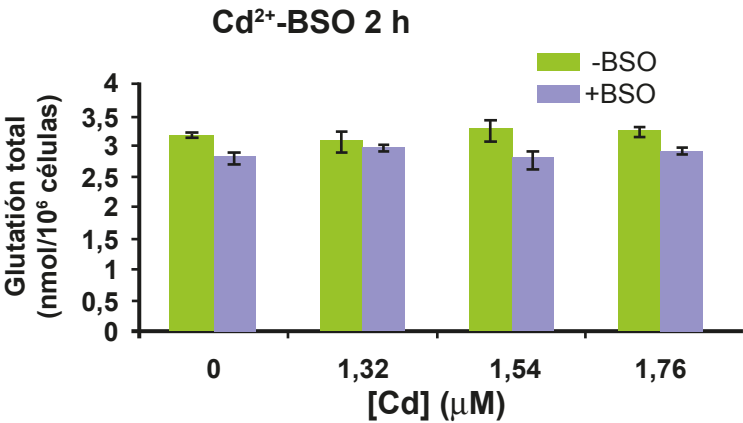
A: 2 horas.

Determinación de glutatión.

[Cd ²⁺] (μM)	Glutatión (nmoles)			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	3,15	0,01	2,81	0,10
1,32	3,07	0,15	2,96	0,02
1,54	3,26	0,17	2,78	0,15
1,76	3,22	0,06	2,90	0,04

Análisis estadístico.

Interacción:	NO (0,077)		
Efecto de BSO:	(0,005)		
Efecto de Cd ²⁺ :	0-1,32: (0,550)	1,32-1,54: (0,897)	1,54-1,76: (0,603)



B: 24 horas.

Determinación de glutatión.

[Cd ²⁺] (μM)	Glutatión (nmoles)			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	3,18	0,02	2,87	0,07
1,32	3,46	0,03	3,29	0,06
1,54	3,46	0,06	3,42	0,12
1,76	3,88	0,05	3,43	0,01

Análisis estadístico.

Interacción:	Sí (0,005)			
Efecto de BSO:				
Cd ²⁺ (0): (0,001)	Cd ²⁺ (1,32): (0,013)	Cd ²⁺ (1,54): (0,253)	Cd ²⁺ (1,76): (0,000)	
Efecto de Cd ²⁺ :				
BSO (-)	0-1,32: (0,000)	1,32-1,54: (0,220)	1,54-1,76: (0,010)	
BSO (+)	0-1,32: (0,000)	1,32-1,54: (0,056)	1,54-1,76: (0,946)	

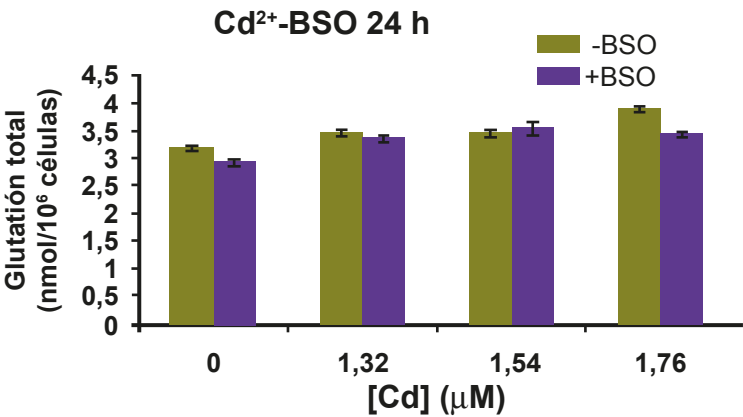


Figura 40. Niveles totales de glutatión, determinados enzimáticamente, en presencia o ausencia de BSO, en poblaciones (18-20 h de crecimiento) de *T. thermophila*, tratadas o no con Cd²⁺. A: exposición durante 2 horas. B: exposición durante 24 horas. En las tablas se recogen los resultados obtenidos (m: valor medio de la cantidad de glutatión; ds: desviación estándar; n: número de determinaciones=3). Valores significativos a p< 0,05 (sombreados en amarillo) Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

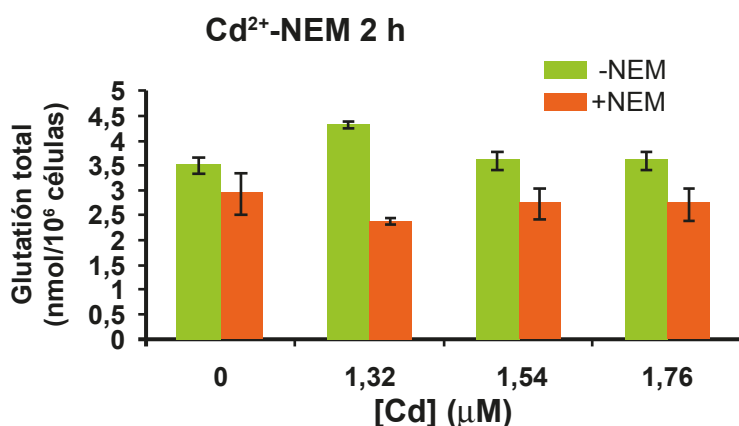
A: 2 horas.

Determinación de glutatión.

[Cd ²⁺] (μM)	Glutatión (nmoles)			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	3,53	0,18	2,94	0,40
1,32	4,32	0,04	2,38	0,00
1,54	3,62	0,18	2,72	0,32
1,76	3,62	0,15	2,72	0,32

Análisis estadístico.

Interacción:	Sí (0,006)		
Efecto de NEM:			
Cd ²⁺ (0): (0,079)	Cd ²⁺ (1,32): (0,000)	Cd ²⁺ (1,54): (0,013)	Cd ²⁺ (1,76): (0,012)
Efecto de Cd ²⁺ :			
NEM (-)	0-1,32: (0,010)	1,32-1,54: (0,014)	1,54-1,76: (0,423)
NEM (+)	0-1,32: (0,136)	1,32-1,54: (0,208)	1,54-1,76: (0,423)



B: 24 horas.

Determinación de glutatión.

[Cd ²⁺] (μM)	Glutatión (nmoles)			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	3,41	0,11	2,46	0,03
1,32	3,46	0,38	2,89	0,23
1,54	3,71	0,12	2,77	0,15
1,76	3,93	0,09	2,97	0,01

Análisis estadístico.

Interacción:	NO (0,108)		
Efecto de NEM:	(0,002)		
Efecto de Cd ²⁺ :	0-1,32: (0,067)	1,32-1,54: (0,719)	1,54-1,76: (0,005)

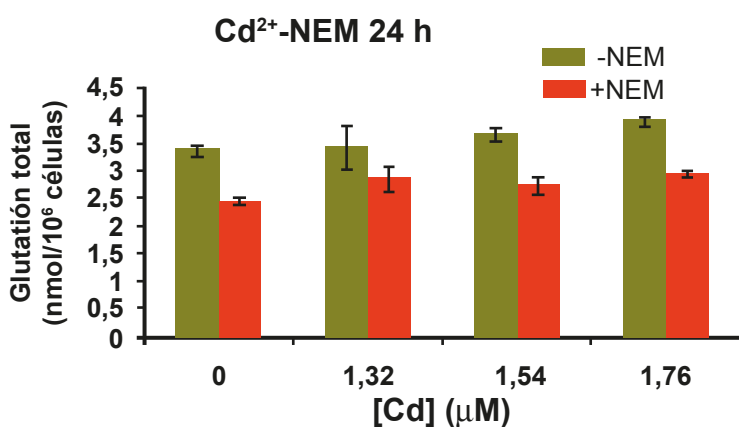


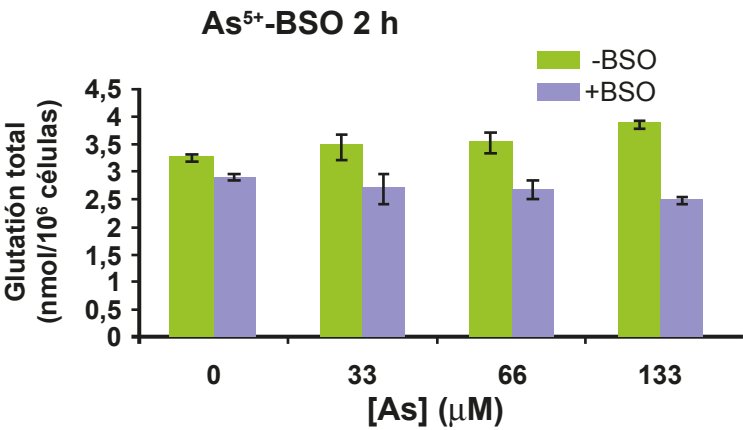
Figura 41. Niveles totales de glutatión, determinados enzimáticamente, en presencia o ausencia de BSO, en poblaciones (18-20 h de crecimiento) de *T. thermophila*, tratadas o no con Cd²⁺. A: exposición durante 2 horas. B: exposición durante 24 horas. En las tablas se recogen los resultados obtenidos (m: valor medio de la cantidad de glutatión; ds: desviación estándar; n: número de determinaciones=3). Valores significativos a p < 0,05 (sombreados en amarillo) Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

Resultados

A: 2 horas.

Determinación de glutatión.

[As ⁵⁺] (μM)	Glutatión (nmoles)			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	3,27	0,06	2,91	0,05
33	3,47	0,23	2,72	0,27
66	3,54	0,28	2,69	0,16
133	3,87	0,05	2,48	0,05



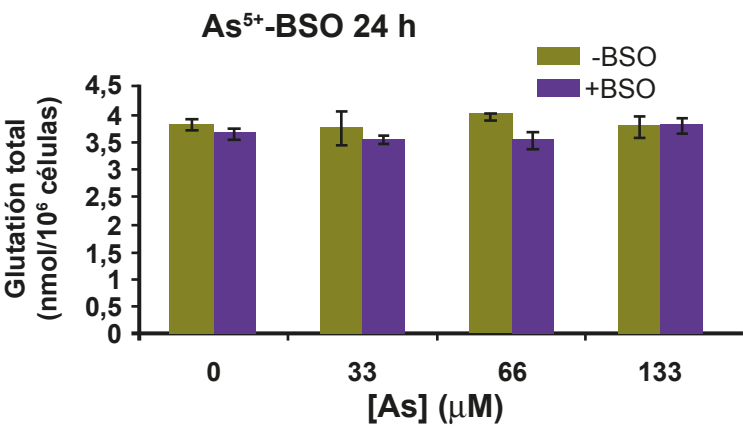
Análisis estadístico.

Interacción:	Sí (0,010)			
Efecto de BSO:				
As ⁵⁺ (0): (0,001)	As ⁵⁺ (33): (0,100)	As ⁵⁺ (33): (0,007)	As ⁵⁺ (133): (0,000)	
Efecto de As ⁵⁺ :				
BSO (-)	0-33: (0,355)	33-66: (0,814)	66-133: (0,123)	
BSO (+)	0-33: (0,527)	33-66: (0,237)	66-133: (0,045)	

B: 24 horas.

Determinación de glutatión.

[As ⁵⁺] (μM)	Glutatión (nmoles)			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	3,82	0,08	3,65	0,07
33	3,75	0,31	3,55	0,05
66	3,99	0,06	3,54	0,16
133	3,79	0,18	3,81	0,13



Análisis estadístico.

Interacción:	NO (0,161)		
Efecto de BSO:	(0,033)		
Efecto de As ⁵⁺ :	0-33: (0,255)	33-66: (0,230)	66-133: (0,204)

Figura 42. Niveles totales de glutatión, determinados enzimáticamente, en presencia o ausencia de BSO, en poblaciones (18-20h de crecimiento) de *T. thermophila*, tratadas o no con As⁵⁺. A: exposición durante 2 horas. B: exposición durante 24 horas. En las tablas se recogen los resultados obtenidos (m: valor medio de la cantidad de glutatión; ds: desviación estándar; n: número de determinaciones=3). Valores significativos a p< 0,05 (sombreados en amarillo). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

A: 2 horas.

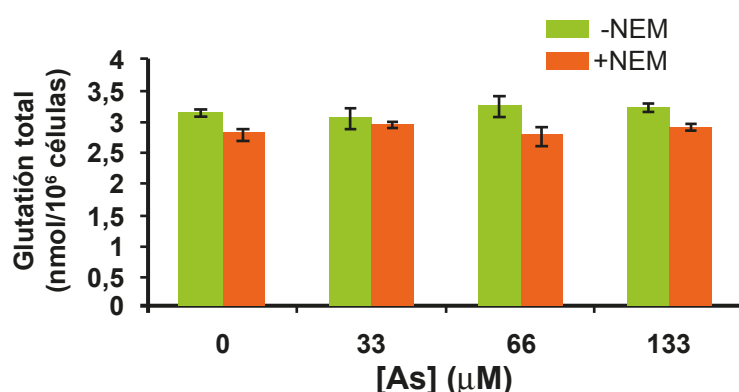
Determinación de glutatión.

[As ⁵⁺] (μ M)	Glutatión (nmoles)			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	3,28	0,04	2,88	0,07
33	3,71	0,19	3,15	0,02
66	3,84	0,07	3,26	0,22
133	4,06	0,11	3,45	0,29

Análisis estadístico.

Interacción:	NO (0,461)		
Efecto de NEM:	(0,002)		
Efecto de As ⁵⁺ :	0-33: (0,008)	33-66: (0,163)	66-133: (0,026)

As⁵⁺-NEM 2 h



B: 24 horas.

Determinación de glutatión.

[As ⁵⁺] (μ M)	Glutatión (nmoles)			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	3,72	0,09	2,55	0,13
33	4,06	0,25	2,34	0,02
66	3,11	0,10	2,26	0,04
133	2,63	0,07	2,17	0,07

Análisis estadístico.

Interacción:	Sí (0,003)		
Efecto de NEM:			
As ⁵⁺ (0): (0,000)	As ⁵⁺ (33): (0,007)	As ⁵⁺ (33): (0,002)	As ⁵⁺ (133): (0,001)
Efecto de As ⁵⁺ :			
NEM (-)	0-33: (0,067)	33-66: (0,043)	66-133: (0,020)
NEM (+)	0-33: (0,100)	33-66: (0,038)	66-133: (0,042)

As⁵⁺-NEM 24 h

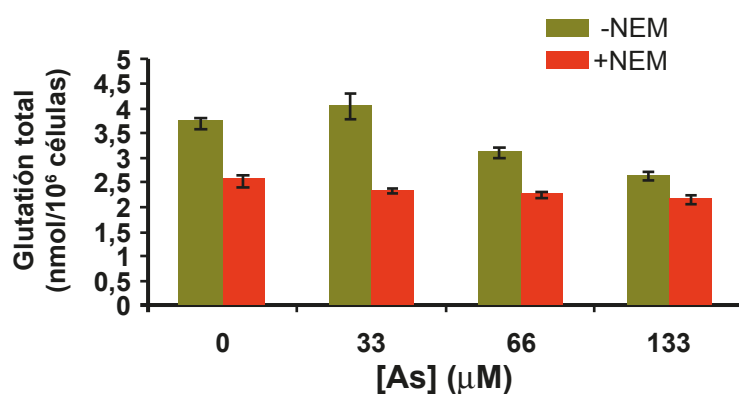


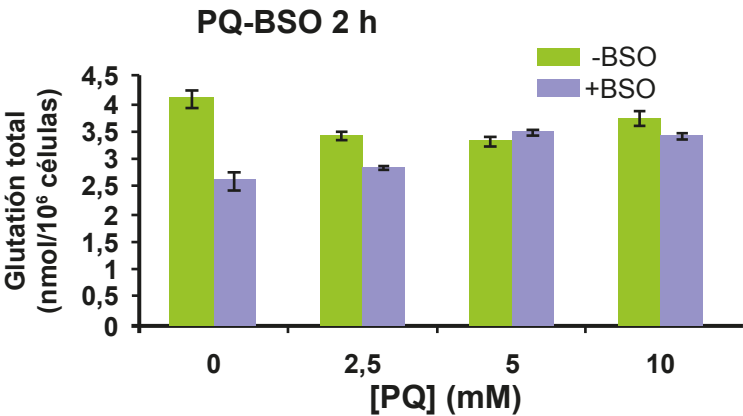
Figura 43. Niveles totales de glutatión, determinados enzimáticamente, en presencia o ausencia de NEM, en poblaciones (18-20h de crecimiento) de *T. thermophila*, tratadas o no con As⁵⁺. A: exposición durante 2 horas. B: exposición durante 24 horas. En las tablas se recogen los resultados obtenidos (m: valor medio de la cantidad de glutatión; ds: desviación estándar; n: número de determinaciones=3). Valores significativos a $p < 0,05$ (sombreados en amarillo). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

Resultados

A: 2 horas.

Determinación de glutatión.

[PQ] (mM)	Glutatión (nmoles)			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	4,11	0,15	2,61	0,17
2,5	3,44	0,06	2,84	0,01
5	3,34	0,09	3,49	0,03
10	3,74	0,14	3,41	0,06



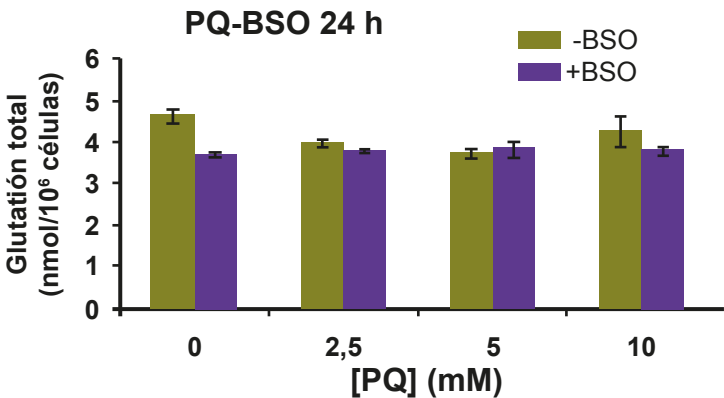
Análisis estadístico.

Interacción:	Sí (0,000)		
Efecto de BSO:			
PQ(0): (0,000)	PQ(2,5): (0,003)	PQ(5): (0,058)	PQ(10): (0,017)
Efecto de PQ:			
BSO (-)	0-2,5: (0,008)	2,5-5: (0,383)	5-10: (0,089)
BSO (+)	0-2,5: (0,060)	2,5-5: (0,000)	5-10: (0,225)

B: 24 horas.

Determinación de glutatión.

[PQ] (mM)	Glutatión (nmoles)			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	4,65	0,17	3,72	0,06
2,5	3,97	0,09	3,79	0,06
5	3,74	0,12	3,85	0,20
10	4,28	0,36	3,81	0,11



Análisis estadístico.

Interacción:	NO (0,092)		
Efecto de BSO:	(0,013)		
Efecto de PQ:	0-2,5: (0,003)	2,5-5: (0,528)	5-10: (0,728)

Figura 44. Niveles totales de glutatión, determinados enzimáticamente, en presencia o ausencia de BSO, en poblaciones (18-20h de crecimiento) de *T. thermophila*, tratadas o no con PQ. A: exposición durante 2 horas. B: exposición durante 24 horas. En las tablas se recogen los resultados obtenidos (m: valor medio de la cantidad de glutatión; ds: desviación estándar; n: número de determinaciones=3). Valores significativos a $p < 0,05$ (sombreados en amarillo). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

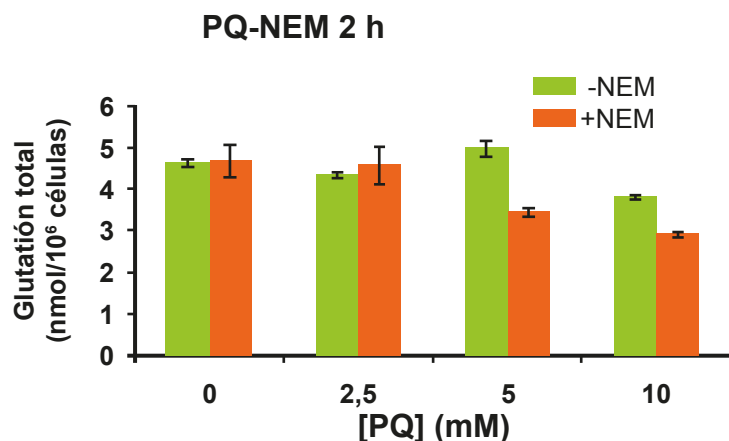
A: 2 horas.

Determinación de glutatión.

[PQ] (mM)	Glutatión (nmoles)			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	4,65	0,07	4,70	0,40
2,5	4,34	0,05	4,59	0,45
5	5,00	0,17	3,47	0,12
10	3,81	0,02	2,91	0,05

Análisis estadístico.

Interacción:	Sí (0,005)		
Efecto de NEM:			
PQ(0): (0,357)	PQ(2,5): (0,605)	PQ(5): (0,000)	PQ(10): (0,000)
Efecto de PQ:			
NEM (-)	0-2,5: (0,021)	2,5-5: (0,024)	5-10: (0,011)
NEM (+)	0-2,5: (0,120)	2,5-5: (0,100)	5-10: (0,225)



B: 24 horas.

Determinación de glutatión.

[PQ] (mM)	Glutatión (nmoles)			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	4,54	0,02	3,32	0,16
2,5	5,17	0,12	3,66	0,09
5	4,52	0,32	3,77	0,21
10	4,37	0,08	3,37	0,08

Análisis estadístico.

Interacción:	NO (0,087)		
Efecto de NEM:	(0,000)		
Efecto de PQ:	0-2,5: (0,006)	2,5-5: (0,002)	5-10: (0,850)

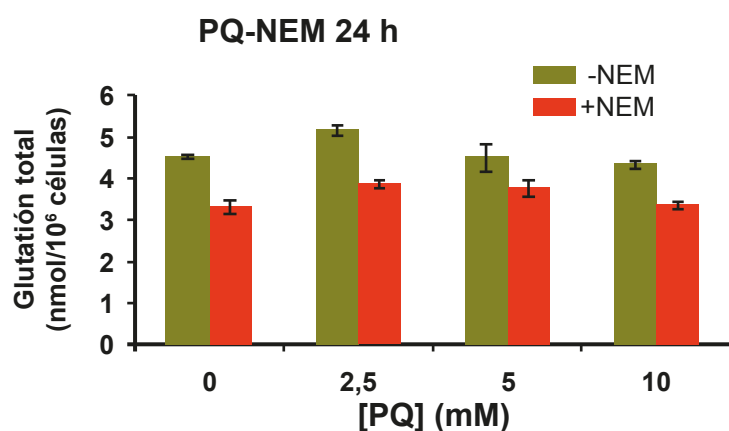


Figura 45. Niveles totales de glutatión, determinados enzimáticamente, en presencia o ausencia de NEM, en poblaciones (18-20h de crecimiento) de *T. thermophila*, tratadas o no con PQ. A: exposición durante 2 horas. B: exposición durante 24 horas. En las tablas se recogen los resultados obtenidos (m: valor medio de la cantidad de glutatión; ds: desviación estándar; n: número de determinaciones=3). Valores significativos a $p < 0,05$ (sombreados en amarillo). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

Resultados

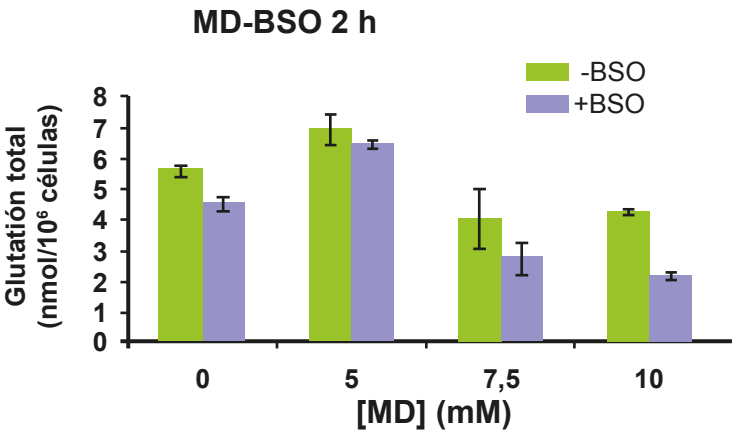
A: 2 horas.

Determinación de glutatión.

[MD] (mM)	Glutatión (nmoles)			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
0	5,63	0,20	4,54	0,23
5	6,96	0,47	6,49	0,13
7,5	4,08	0,98	2,77	0,51
10	4,28	0,05	2,17	0,08

Análisis estadístico.

Interacción:	NO (0,179)		
Efecto de BSO:	(0,007)		
Efecto de MD:	0-5: (0,086)	5-7,5: (0,002)	7,5-10: (0,094)

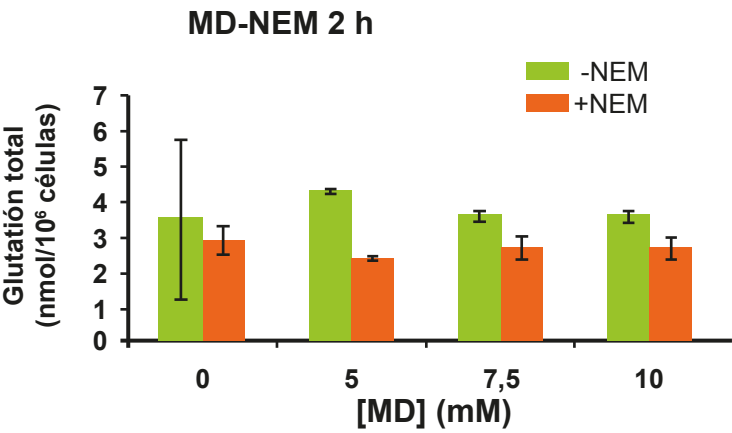


B: 24 horas.

Determinación de glutatión.

[MD] (mM)	Glutatión (nmoles)			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
0	3,53	2,25	2,94	0,40
5	4,33	0,04	2,38	0,00
7,5	3,60	0,18	2,75	0,32
10	3,62	0,15	2,72	0,35

Análisis estadístico.



Interacción:	NO (0,126)		
Efecto de NEM:	(0,127)		
Efecto de MD:	0-5: (0,100)	5-7,5: (0,003)	7,5-10: (0,099)

Figura 46. Niveles totales de glutatión, determinados enzimáticamente, en presencia o ausencia de BSO (A) o NEM (B), en poblaciones (18-20h de crecimiento) de *T. thermophila*, tratadas o no con MD durante 2 horas. En las tablas se recogen los resultados obtenidos (m: valor medio de la cantidad de glutatión; ds: desviación estándar; n: número de determinaciones=3). Valores significativos a $p < 0,05$ (sombreados en amarillo). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

A: 2 horas.

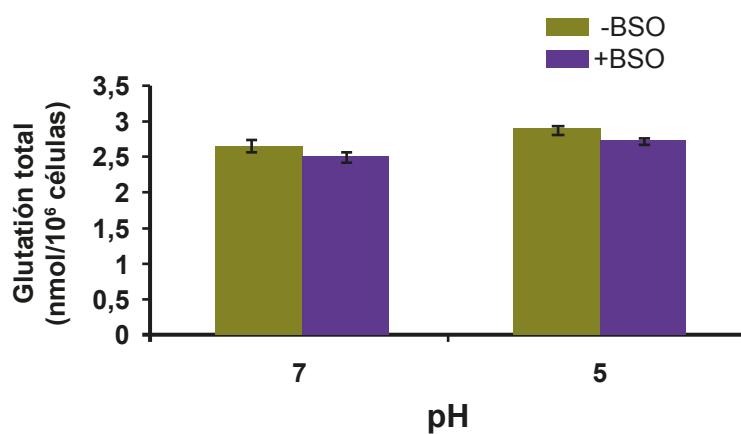
Determinación de glutatión.

pH	Glutatión (nmoles)			
	- BSO		+ BSO	
	m	ds	m	ds
7	2,66	0,10	2,50	0,05
5	2,90	0,06	2,72	0,03

Análisis estadístico.

Interacción:	NO (0,730)
Efecto de BSO:	(0,025)
Efecto de pH:	pH7-pH5 (0,001)

pH-BSO 24 h



B: 24 horas.

Determinación de glutatión.

pH	Glutatión (nmoles)			
	- NEM		+ NEM	
	m	ds	m	ds
7	5,46	0,31	5,16	0,22
5	5,45	0,09	5,05	0,16

Análisis estadístico.

Interacción:	NO (0,761)
Efecto de NEM:	(0,006)
Efecto de pH:	pH7-pH5 (0,744)

pH-NEM 24 h

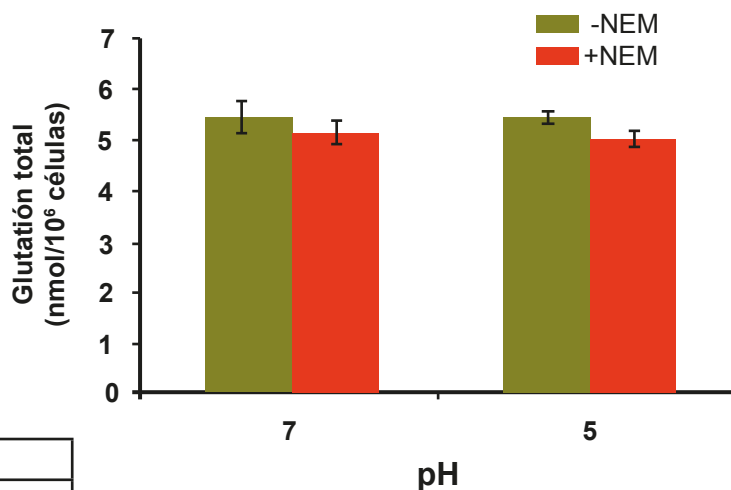


Figura 47. Niveles totales de glutatión, determinados enzimáticamente, en presencia o ausencia de BSO (A) o NEM (B), en poblaciones (18-20h de crecimiento) de *T. thermophila*, mantenidas a pH 7 o pH 5 durante 24 horas. En las tablas se recogen los resultados obtenidos (m: valor medio de la cantidad de glutatión; ds: desviación estándar; n: número de determinaciones=3). Valores significativos a $p < 0,05$ (sombreados en amarillo). Para una mejor comprensión de estas tablas consultar Anexo I.

Resultados

de glutatión total entre los controles no tratados y los tratados con paraquat. Sin embargo, cuando las exposiciones son más cortas (2 h), parece existir una interacción estadísticamente significativa entre PQ y BSO, de manera que, dependiendo de la presencia o ausencia de BSO, se produce un aumento o una disminución de los niveles de glutatión, como se muestra en la Figura 45. Por ejemplo, en ausencia de BSO, se produce un descenso significativo de los niveles de glutatión entre el control y los tratados, mientras que en presencia de BSO hay un incremento significativo entre las concentraciones 2,5 y 5 mM. En los experimentos con NEM, el tiempo de tratamiento con PQ también parece ser un factor importante para la existencia o no de una interacción NEM-PQ. En periodos cortos de tratamiento (2h) (Figura 46A) es cuando se establece una interacción, estadísticamente significativa, entre ambos componentes del medio. En estos tratamientos cortos y en ausencia de NEM se produce una disminución del glutatión entre el control y la concentración más baja (2,5 mM). Sin embargo cuando aumentamos la concentración de PQ a 5 mM, los niveles de glutatión aumentan de forma significativa, que vuelven a disminuir cuando la concentración de PQ se eleva a 10 mM (Figura 46A). En presencia de NEM únicamente hay reducción significativa en la cantidad de glutatión total, entre las dos últimas concentraciones (5 y 10 mM). Cuando las exposiciones son de 24 h, en presencia de NEM se detecta una disminución en los niveles totales de glutatión respecto a los valores obtenidos en ausencia de NEM e independientemente de la concentración de PQ utilizada (Figura 46B). Igualmente, a 24 h, como sucedía a 2 h, existe un patrón de aumento y disminución de los niveles de glutatión. Entre el control y la primera concentración de PQ (2,5 mM) se produce un aumento significativo del glutatión, pero cuando aumentamos la concentración a 5mM los niveles disminuyen de forma significativa.

Como se indicó anteriormente, las exposiciones al agente oxidante menadiona (MD) siempre se realizan exclusivamente a 2 h debido a la alta toxicidad que presenta este agente oxidante en el ciliado *T. thermophila*. En presencia de MD, los niveles de glutatión muestran patrones similares tanto en ausencia como en presencia de BSO (Figura 46A). Existe un incremento de los niveles de glutatión a la concentración más baja de MD, seguida de una disminución proporcional a la concentración de MD utilizada (Figura 46A). Con respecto a la presencia de NEM en el medio (Figura 46B), los patrones de glutatión a las diferentes concentraciones de MD no se diferencian mucho respecto de la ausencia del mismo. Al igual que ocurría con el BSO, la presencia de NEM disminuye los valores promedio de glutatión respecto de aquellos obtenidos en su ausencia (Figura 46B).

Antes de comentar el efecto del pH (24 h) sobre los niveles totales de glutatión, en presencia o ausencia de compuestos que modifican la concentración intracelular de grupos tióli-

cos, es conveniente diferenciar los protocolos experimentales utilizados. El tratamiento con BSO se produce 20 horas antes que el cambio de pH, de forma que los cultivos son más antiguos que en los experimentos con NEM, donde el tratamiento con NEM se produce 24 horas después del descenso de pH y sólo media hora antes a la cuantificación de glutatión. Como se aprecia en la Figura 47 (A y B), tanto BSO como NEM provocan un descenso significativo de los niveles de glutatión. Sin embargo, únicamente se detecta efecto del pH ácido en los experimentos de BSO (en los cuales la población está expuesta a este pH 20 horas más que en los experimentos con NEM), produciendo un aumento del glutatión total.

3. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN CODIFICANTE DE LA GLUTAMATO CISTEÍNA LIGASA (GCL) DE *Tetrahymena thermophila*.

Como se indicó en la Introducción, el glutatión se sintetiza mediante una ruta específica, dependiente de ATP, que en la mayoría de los organismos eucariotas comprende dos etapas distintas. La primera de ellas, está catalizada por la enzima glutamato cisteína ligasa, y se considera la más importante, ya que el dipéptido γ -glutamilcisteína es funcional como antioxidante, al menos en levaduras. En el genoma macronuclear de *Tetrahymena thermophila* hemos localizado un único gen potencialmente codificante de una γ -glutamilcisteína ligasa (GCL), numerado como TTHERM_00250970, el cual hemos denominado *TtGCL*. La longitud total de este gen es de 1.279 pb, y el análisis bioinformático ha mostrado la existencia de un intrón de 79 pb entre las posiciones +48 y +126 (Anexo II, figura 1A(II)). El gen *TtGCL* codifica una proteína de 405 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 47,6 KDa. El dominio típico de actividad γ -glutamilcisteína ligasa está comprendido entre los aminoácidos que ocupan las posiciones 38 y 393. En *T. thermophila* esta enzima parece ser monomérica, ya que no se ha encontrado en el genoma macronuclear de este ciliado, ningún otro gen codificante de una posible subunidad reguladora. Tras llevar a cabo un análisis de identidad de las secuencias aminoacídicas de diversas GCLs, incluyendo la de *T. thermophila* (Figura 48), se puede comprobar que el mayor porcentaje de similitud de la GCL de *T. thermophila* (65 %), es con la hipotética GCL del ciliado ectoparásito de peces *Ichthyophthirius multifiliis* (65%), seguido del ciliado *Paramecium tetraurelia* (49%). Además, en general, la GCL de *Tetrahymena* presenta mayor identidad (47-49 %) con las GCLs de mamíferos y otros animales, que con las GCLs procedentes de otros microorganismos eucariotas, como *Neurospora crassa* (39 %) o *Trypanosoma brucei* (42 %) (Figura 48). Por el contrario, apenas guarda similitud con las GCLs bacterianas o de plantas (entre otras), obteniéndose porcentajes de semejanza comprendidos entre el 7-15 % (datos no mostrados).

	AfGCL	ScGCL	NcGCL	CeGCL	DmGCL	DrGCL	MmGCL	RnGCL	HsGCL	TtGCL	ImGCL	PtGCL	TbGCL
AfGCL		53	74	58	52	59	61	61	61	44	50	44	49
ScGCL			49	52	45	52	54	54	54	40	46	38	43
NcGCL				52	48	52	55	55	55	38	45	37	44
CeGCL					59	64	67	67	68	46	52	46	49
DmGCL						59	64	64	63	39	45	39	41
DrGCL							81	81	82	54	56	46	49
MmGCL								99	96	48	53	48	52
RnGCL									96	48	53	47	52
HsGCL										48	54	47	52
TtGCL											65	49	40
ImGCL												50	46
PtGCL													39
TbGCL													

Figura 48. Matriz de identidad de las GCLs de diversos organismos. Af: *Aspergillus fumigatus*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Dr: *Danio rerio*, Hs: *Homo sapiens*, Im: *Ichthyophthirius multifiliis*, Mm: *Mus musculus*, Nc: *Neurospora crassa*, Pt: *Paramecium tetraurelia*, Rn: *Rattus norvegicus*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Tb: *Trypanosoma brucei*, Tt: *Tetrahymena thermophila*.

Debido a la importancia de este gen en la ruta biosintética del glutatión, se llevó a cabo un estudio de la expresión del gen *TtGCL* (mediante RT-PCR cuantitativa) en muestras tratadas con distintos metales pesados (Cd^{2+} , Cu^{2+} , As^{5+} , Pb^{2+} ó Zn^{2+}), agentes oxidantes (PQ, MD o CDNB) y otros agentes estresantes o condiciones de estrés, como diferentes pHs e inanición prolongada (48 h). Los resultados de los niveles relativos de expresión del gen *TtGCL* se muestran en la Figura 49 y en la Tabla 1A(III) del Anexo III. Los resultados indican que la mayoría de los tratamientos metálicos inducen significativamente la expresión de este gen, a excepción del Cu^{2+} que no induce significativamente la expresión de este gen (Tabla 1A(III) del Anexo III). Sin embargo, se aprecian diferencias notables en los niveles de inducción, según la naturaleza química del catión metálico y el tiempo aplicado en los tratamientos. En todos los casos en donde existe inducción, los tratamientos metálicos cortos (2 h) mostraron mayores niveles de inducción que las exposiciones metálicas más prolongadas (24 h) para el mismo metal (Figura 49). El metal que más induce este gen es el As^{5+} (89 veces el valor basal como promedio). Otros metales inductores de este gen, como el Cd^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} , presentan niveles de inducción similares a 2 h de tratamiento (6,5 ó 7 veces como valor medio) (Tabla 1A(III) del Anexo III, Figura 49). En las exposiciones metálicas durante 24 h, se reducen considerablemente los valores de inducción para los metales que inducen la expresión de este gen, siendo el Pb^{2+} el que menos reduce los

niveles de expresión tras 24 h (Tabla 1A(III) del Anexo III, Figura 49). Al igual que ocurre con la mayoría de los metales, la presencia de agentes oxidantes (PQ, MD ó CDNB) también produjo una sobreexpresión del gen *TtGCL*, especialmente la MD, que es el más potente agente inductor de los empleados en este estudio, ya que causa un incremento elevado (123 veces los niveles basales) a las 2 h (Figura 49). Con respecto al pH del medio, sólo la acidificación (pH 5) induce de forma muy considerable la expresión del gen *TtGCL* (120 veces) (Figura 49, Tabla 1A(III) del Anexo III), no así el pH 9 que no induce este gen. La falta de nutrientes, durante 24 h, también produce un ligero incremento, aunque no significativo, en la expresión de este gen (3 veces) (Figura 49, Tabla 1A(III) del Anexo III).

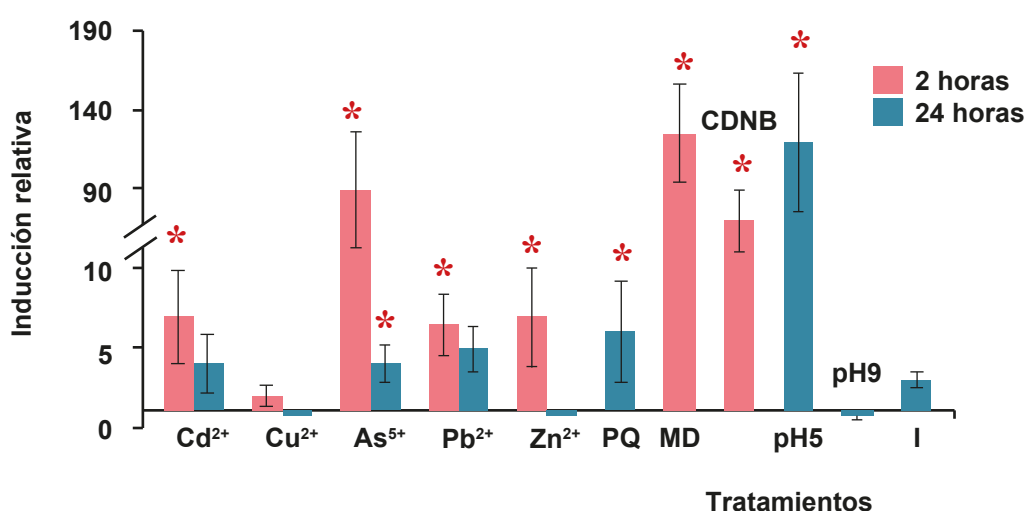


Figura 49. Niveles de inducción relativa de la expresión del gen *TtGCL*. Tratamientos: Cd²⁺: 44 µM, Cu²⁺: 400 µM, As⁵⁺: 100µM, Pb²⁺: 950 µM, Zn²⁺: 3.500 µM, PQ: paraquat (7.800 µM), MD: menadiona (5.000 µM), CDNB: 2-cloro-dinitrobenzoceno (200 µM), I: inanición (falta de nutrientes). Los asteriscos señalan los tratamientos que producen efectos significativos sobre la expresión del gen (valor p < 0,05). Datos reflejados en la Tabla 1A(III) del Anexo III.

4. ANÁLISIS *in silico* Y DE LA EXPRESIÓN DE GENES HOMÓLOGOS DE GLUTATIÓN S-TRANSFERASAS PRESENTES EN *T. thermophila*.

4.1 Análisis *in silico*.

Las glutatión transferasas (GSTs) son enzimas multifuncionales imprescindibles en el metabolismo celular, implicadas principalmente en la conjugación de glutatión a compuestos de muy diversa naturaleza, considerados genéricamente como contaminantes ambientales, que suelen ser tóxicos para los seres vivos. Esta unión con glutatión conlleva la pérdida o disminución de la biotoxicidad del compuesto tóxico al cual se une. Por tanto, las glutatión transferasas son moléculas universales que están involucradas en la respuesta celular de de-

Resultados

fensa frente a condiciones ambientales adversas, considerándose uno de los principales biomarcadores moleculares de estrés y contaminación ambiental (Frova, 2006). Como se indicó en la introducción, esta superfamilia de proteínas presenta 3 familias distintas en los organismos eucariotas; citosólicas, mitocondriales y microsomales, según su localización celular. La familia de las GSTs citosólica es la más numerosa y se distribuye en, al menos, 15 clases distintas, de las cuales 3 clases (Zeta, Theta y Omega) tienen una distribución universal, es decir, se encuentran en todos los filos de seres vivos.

En el genoma macronuclear del protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila*, hemos localizado 63 genes ortólogos de GSTs, que codifican para proteínas con dominios glutatión S-transferasa. La denominación de los genes se ha realizado, como es perceptivo, siguiendo las mismas reglas establecidas por el Comité para la Nomenclatura de Genes Humanos, de tal forma que el prefijo Tt indica que pertenecen a la especie *T. thermophila* y las siglas GST corresponden a la denominación de la enzima, glutatión S-transferasa. Para su clasificación, se realizó un estudio de similitud de las secuencias proteicas con las GSTs publicadas de otras especies biológicas. Por convenio, se ha establecido que para incluir una secuencia de GST en una determinada clase la identidad de la misma con el resto de las GSTs de esa clase debe ser superior al 40 %, mientras que las GSTs de distintas clases muestran una identidad de secuencias inferior al 25 %. La denominación de cada clase se especifica con una letra mayúscula, que corresponde a la inicial del nombre de cada clase, por ejemplo, M para la clase Mu; T para la clase Theta, O para la clase Omega o Z para la clase Zeta. Cuando una secuencia de una putativa GST de *Tetrahymena* presenta porcentajes de identidad inferiores al 40 %, con respecto a las secuencias descritas como patrón o referencia de cada clase, no es posible asignarla a ninguna clase descrita previamente. A estas secuencias que, en principio, podrían establecer una nueva clase (específica de grupo biológico) de GST, se les asigna con la letra N, en el lugar correspondiente a la denominación de la clase. Algunas características de estos genes y sus productos inferidos (proteínas) se muestran en la Tabla 13. Las 63 posibles isoformas identificadas de GSTs de *T. thermophila* se han incluido dentro de cuatro clases conocidas distintas, de manera que, 5 isoformas se han identificado como pertenecientes a la clase Theta, 7 isoformas se han incluido en la clase Omega, 2 isoformas en la clase Zeta, 47 isoformas corresponden a la clase Mu, y, por último, 2 isoformas no pueden incluirse en ninguna de las clases descritas hasta el momento, por lo que se incluyen y denominan "N" (Tabla 13). Como se puede comprobar (Tabla 13), en *T. thermophila* los genes codificantes de putativas GSTs tienen una longitud muy diversa, incluso entre aquellos incluidos en una misma clase, que oscila entre 6.050 nucleótidos (*TtGSM1*) y 542 nucleótidos (*TtGSTT1*), aunque la mayoría presenta un tamaño comprendido entre 600 y 850 nucleótidos. En general, la mayoría de estos genes no presentan intrones; un 79 % de los inclui-

Gen	Denominación ¹	Longitud (pb)	Intrones	Proteína (aa)	Masa molecular	CR	Región cromosómica
<i>TtGSTM1</i>	TTHERM_00672290	6.050	7	805	90,60	1R	scf_8254199
<i>TtGSTM2</i>	TTHERM_00516420	737	1	215	26,10	1R	scf_8254654
<i>TtGSTM3</i>	TTHERM_00516440	2.482	3	389	46,12	1R	scf_8254654
<i>TtGSTM4</i>	TTHERM_00518470	2.328	2	392	46,46	1R	scf_8254645
<i>TtGSTM5</i>	TTHERM_00129770	702	0	233	28,17	5	scf_8254645
<i>TtGSTM6</i>	TTHERM_00166100	660	0	219	25,54	Nd	scf_8254798
<i>TtGSTM7</i>	TTHERM_00169100	660	0	219	25,44	Nd	scf_8254798
<i>TtGSTM8</i>	TTHERM_00169110	3.321	1	725	80,49	Nd	scf_8254798
<i>TtGSTM9</i>	TTHERM_00661620	657	0	218	25,04	5	scf_8254577
<i>TtGSTM10</i>	TTHERM_00661640	2.789	1	368	42,80	5	scf_8254577
<i>TtGSTM11</i>	TTHERM_00661650	660	0	219	25,09	5	scf_8254577
<i>TtGSTM12</i>	TTHERM_00661660	787	0	219	25,19	5	scf_8254577
<i>TtGSTM13</i>	TTHERM_00661570	730	0	239	28,52	5	scf_8254577
<i>TtGSTM14</i>	TTHERM_00661630	1.504	1	244	29,29	5	scf_8254577
<i>TtGSTM15</i>	TTHERM_00463010	684	0	227	27,02	4R	scf_8254593
<i>TtGSTM16</i>	TTHERM_00689990	723	0	240	28,93	1L	scf_8253915
<i>TtGSTM17</i>	TTHERM_00077530	711	0	236	28,04	Nd	scf_8254650
<i>TtGSTM18</i>	TTHERM_00077550	705	0	234	28,05	Nd	scf_8254650
<i>TtGSTM19</i>	TTHERM_00077560	629	1	165	19,77	Nd	scf_8254650
<i>TtGSTM20</i>	TTHERM_00151420	609	0	202	24,39	1R	scf_8254545
<i>TtGSTM21</i>	TTHERM_00274620	612	0	203	23,65	5	scf_8254649
<i>TtGSTM22</i>	TTHERM_00569160	606	0	201	23,23	4L	scf_8254431
<i>TtGSTM23</i>	TTHERM_00569200	606	0	201	23,14	4L	scf_8254431
<i>TtGSTM24</i>	TTHERM_00569210	609	0	202	23,50	4L	scf_8254431
<i>TtGSTM25</i>	TTHERM_01289030	603	0	200	23,09	4L	scf_8254431
<i>TtGSTM26</i>	TTHERM_00332090	621	0	206	23,94	4R	scf_8254010
<i>TtGSTM27</i>	TTHERM_00895750	666	0	221	25,93	Nd	scf_8254707
<i>TtGSTM28</i>	TTHERM_00895760	666	0	221	25,97	Nd	scf_8254707
<i>TtGSTM29</i>	TTHERM_00895770	666	0	221	25,97	Nd	scf_8254707
<i>TtGSTM30</i>	TTHERM_00630260	663	0	220	25,72	2R	scf_8254470
<i>TtGSTM31</i>	TTHERM_00211500	642	0	213	24,66	Nd	scf_8254815
<i>TtGSTM32</i>	TTHERM_00405440	642	0	213	24,75	4L	scf_8254666
<i>TtGSTM33</i>	TTHERM_00211510	627	0	208	24,30	Nd	scf_8254815
<i>TtGSTM34</i>	TTHERM_00405500	627	0	208	24,25	4L	scf_8254666
<i>TtGSTM35</i>	TTHERM_00405450	627	0	208	24,29	4L	scf_8254666
<i>TtGSTM36</i>	TTHERM_00405470	627	0	208	24,37	4L	scf_8254666
<i>TtGSTM37</i>	TTHERM_00405400	627	0	208	24,25	4L	scf_8254666
<i>TtGSTM38</i>	TTHERM_00630270	627	0	208	24,39	2R	scf_8254470
<i>TtGSTM39</i>	TTHERM_00490890	624	0	207	24,04	Nd	scf_8254636
<i>TtGSTM40</i>	TTHERM_00602860	669	0	222	25,53	Nd	scf_8254754
<i>TtGSTM41</i>	TTHERM_00490870	672	0	223	26,02	Nd	scf_8254636
<i>TtGSTM42</i>	TTHERM_00490880	669	0	222	25,72	Nd	scf_8254636
<i>TtGSTM43</i>	TTHERM_00490900	645	0	214	25,11	Nd	scf_8254636
<i>TtGSTM44</i>	TTHERM_00602870	618	0	205	23,88	Nd	scf_8254754
<i>TtGSTM45</i>	TTHERM_00723630	2.881	4	761	88,91	Nd	scf_8254636
<i>TtGSTM46</i>	TTHERM_00794370	744	0	247	29,22	Nd	scf_8254552
<i>TtGSTM47</i>	TTHERM_00205200	675	0	224	26,64	Nd	scf_8254815

Tabla 13. Listado de genes ortólogos de GSTs encontrados en el genoma macronuclear del ciliado *T. thermophila*. Continuación en la página siguiente.

Resultados

Gen	Denominación ¹	Longitud (pb)	Intrones	Proteína (aa)	Masa molecular	CR	Región cromosómica
<i>TtGSTT1</i>	TTHERM_00729240	542	0	233	27,96	Nd	scf_8254476
<i>TtGSTT2</i>	TTHERM_00161470	690	0	229	27,13	Nd	scf_8254476
<i>TtGSTT3</i>	TTHERM_00499540	711	0	236	27,97	1R	scf_8254487
<i>TtGSTT4</i>	TTHERM_00499550	693	0	230	27,16	1R	scf_8254487
<i>TtGSTT5</i>	TTHERM_00260690	3.295	2	405	47,38	Nd	scf_8254788
<i>TtGSTO1</i>	TTHERM_00924320	928	2	270	31,63	Nd	scf_8254550
<i>TtGSTO2</i>	TTHERM_00034950	780	0	259	30,57	3L	scf_8254667
<i>TtGSTO3</i>	TTHERM_00400730	839	1	259	30,78	4L	scf_8254666
<i>TtGSTO4</i>	TTHERM_00572000	843	1	259	30,66	4L	scf_8254431
<i>TtGSTO5</i>	TTHERM_00572010	842	1	259	30,48	4L	scf_8254431
<i>TtGSTO6</i>	TTHERM_00572020	833	1	259	30,48	4L	scf_8254431
<i>TtGSTO7</i>	TTHERM_00630450	893	1	258	30,00	2R	scf_8254470
<i>TtGSTZ1</i>	TTHERM_00575360	785	2	220	25,21	4L	scf_8254752
<i>TtGSTZ2</i>	TTHERM_00575390	773	2	219	25,29	4L	scf_8254752
<i>TtGSTN1</i>	TTHERM_00041590	699	0	232	26,12	3L	scf_8254667
<i>TtGSTN2</i>	TTHERM_00402120	1.233	0	410	46,48	4L	scf_8254666

Tabla 13. Listado de genes ortólogos de GSTs encontrados en el genoma macronuclear del ciliado *T. thermophila*. Se incluye nuestra propuesta de denominación del gen, longitud del gen (nucleótidos), número de intrones, longitud de la proteína inferida, la masa molecular (kDa) inferida y su localización cromosómica. CR: cromosoma. 1R: brazo derecho del cromosoma 1, 2R: brazo derecho del cromosoma 2, 3L: brazo izquierdo del cromosoma 3, 4L: brazo izquierdo del cromosoma 4, 4R: brazo derecho del cromosoma 4, Nd: sin determinar.¹: Denominación según la web del genoma macronuclear de *T. thermophila* (www.ciliate.org).

dos en la clase Mu (*TtGSTM*), un 80 % de los incluidos en la clase Theta (*TtGSTT*) y un 100 % de los clasificados como "N" (*TtGSTN*), por el contrario hay otros en que la mayoría tiene intrones, así como, un 86 % de aquellos incluidos en la clase Omega (*TtGSTO*) o el 100 % de los incluidos en la clase Zeta (*TtGSTZ*) (Tabla 13). El número de intrones suele estar comprendido entre 1 y 2, aunque existe genes con mayor número de intrones que suelen coincidir con las secuencias más largas, así por ejemplo; con 3 intrones (*TtGSTM3*), con 4 (*TtGSTM45*) o incluso 7 intrones (*TtGSTM1*) (Tabla 13).

Con respecto a la localización de estos genes *TtGSTs*, aunque la localización cromosómica de algunos de ellos está todavía por determinar, se puede afirmar que están distribuidos entre los 5 cromosomas que presenta el genoma micronuclear haploide de *T. thermophila* (Tabla 13, Figura 50). Un 57 % de los asignados a la clase mayoritaria Mu están localizados en 1R, 1L, 2R, 4R, 4L y 5, mientras que un 40 % de los asignados a la clase Theta están localizados en 1R, un 86 % de la clase Omega están localizados (2R, 3L y 4L), y todos los de la clase Zeta y "N" están localizados en 4L y 3L (Tabla 13). La mayoría de estos genes que codifican GSTs putativas están localizados en el cromosoma metacéntrico N° 4 (47,5% del total localizado), mayoritariamente

en el brazo izquierdo 4L (17 secuencias). En segundo lugar está el cromosoma N° 5 (que es telocéntrico) con un 22,5% del total de secuencias GSTs localizadas (todas de la clase mayoritaria Mu) (Tabla 13), en tercer lugar (con un 17,5% de las secuencias GSTs localizadas) está el cromosoma 1 metacéntrico (mayoritariamente en el brazo derecho, 1R) que incluye GSTs de las clases Mu y Theta. Y en minoría, están los cromosomas N° 2 (brazo derecho, 2R) y N° 3 (brazo izquierdo, 3L) con un 7,5 y un 5% de las secuencias GSTs, respectivamente (Tabla 13, Figura 50).

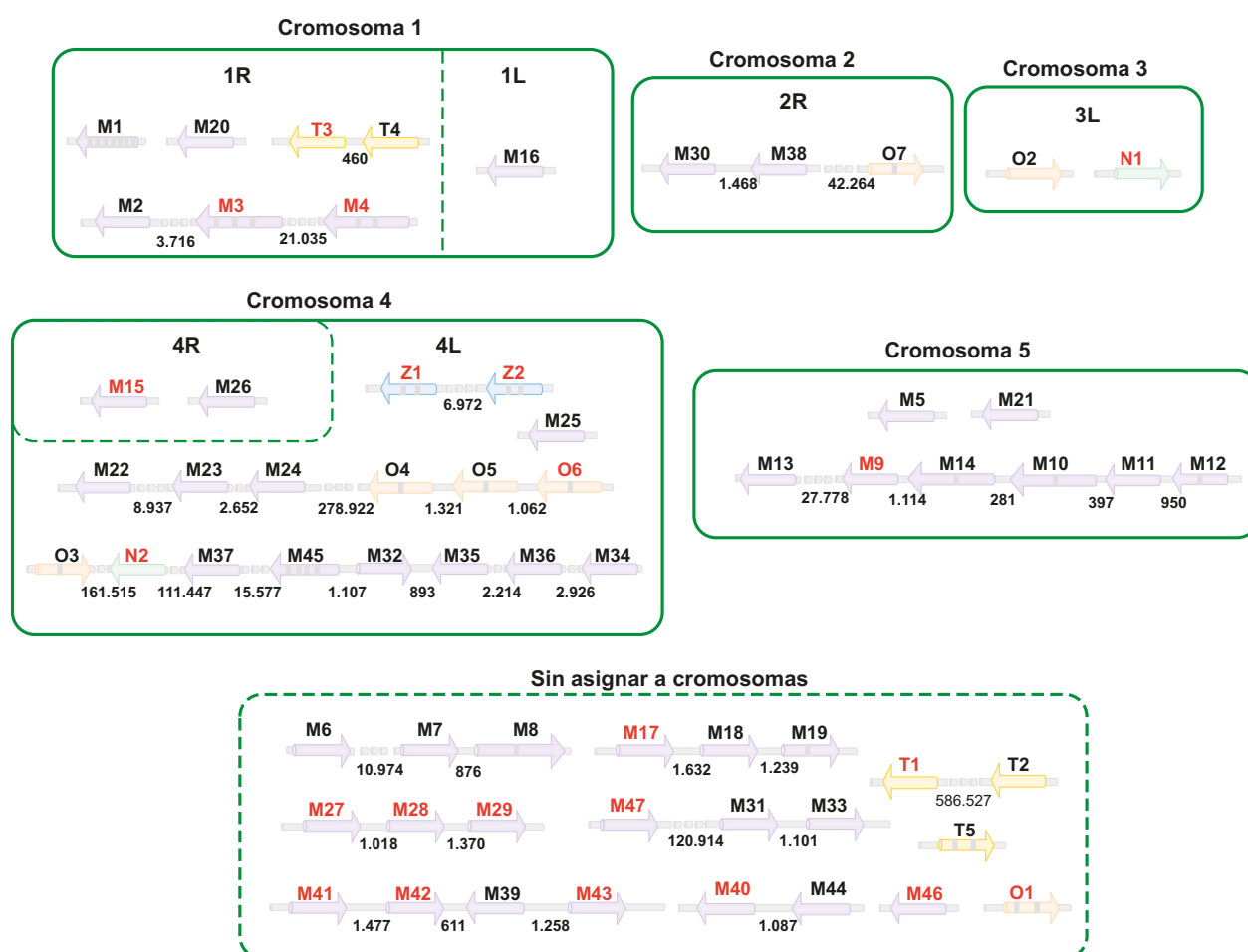


Figura 50. Organización genómica de algunos genes codificantes para GSTs en *Tetrahymena thermophila*. Cada flecha indica un gen y en la parte superior de cada uno de ellos aparece una letra que hace referencia a la clase y el número de orden de la GST que codifican. Los genes especificados en rojo son aquellos de los cuales hemos analizado su expresión por RT-PCR cuantitativa. Entre dos genes adyacentes se indica el número de pares de bases que los separan. Las puntas de cada flecha indica el sentido de la transcripción. Las bandas grises dentro de las flechas representan los intrones. En la parte inferior de la figura se representan los genes que no han sido asignados a algún cromosoma.

Resultados

Un análisis de homología de las secuencias nucleotídicas de las diferentes GSTs putativas presentes en *T. thermophila*, nos indica (Figuras 51, 52 y 53) que los niveles de homología son, en general, bastante altos. La mayoría de las GSTs incluidas en la clase Mu (47 secuencias) (Figura 53) presentan una homología muy alta ($\geq 90\%$) o alta (80-89%) y sólo 4 (*TtGSTM1*, *TtGSTM8*, *TtGSTM17* y *TtGSTM45*) tienen homologías inferiores a un 65% con otras secuencias GSTs de este ciliado (marcadas en azul en Figura 51). Esto indica que las secuencias nucleotídicas son muy parecidas, como el caso extremo de *TtGSTM28* y *TtGSTM29* (con un 100% de homología, entre ellas) (Figuras 53 y 54). Lo cual dificulta el estudio de su expresión génica (ya que los posibles cebadores no distinguirían entre una u otra), y probablemente se han originado por duplicaciones génicas parálogas. Aquellas incluidas en la clase Omega (7 secuencias), presentan entre sí homologías inferiores al 65%, y sólo dos genes (*TtGSTO3* y *TtGSTO4*) presentan entre sí mayores porcentajes de homología (96%) (Figura 51). Las cinco secuencias incluidas en la clase Theta (Figura 52), presentan una muy elevada homología ($\geq 70\%$), excepto la *TtGSTT5* con una baja homología (28-30%).

HOMOLOGÍA NUCLEOTÍDICA	IDENTIDAD AMINOACÍDICA						
	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7
	O1	88	88	88	88	89	88
	O2	46	90	90	90	89	90
	O3	46	58	99	96	93	91
	O4	45	58	96	97	93	91
	O5	46	56	83	84	93	92
	O6	46	54	63	63	62	91
	O7	45	56	59	60	58	57

Figura 51. Matriz de homología nucleotídica (ángulo inferior) e identidad aminoacídica (ángulo superior) de GSTs de clase Omega en *Tetrahymena thermophila*. En color rojo aparecen los porcentajes iguales o superiores a 95%, en morado entre 90 y 94%, en gris entre 80 y 89% y en azul los inferiores a 65%.

HOMOLOGÍA NUCLEOTÍDICA	IDENTIDAD AMINOACÍDICA				
	T1	T2	T3	T4	T5
	T1	90	90	91	79
	T2	70	90	90	79
	T3	72	74	95	79
	T4	72	71	82	79
	T5	30	28	29	28

Figura 52. Matriz de homología nucleotídica (ángulo inferior) e identidad aminoacídica (ángulo superior) de GSTs de clase Theta en *Tetrahymena thermophila*. En color rojo aparecen los porcentajes iguales o superiores a 95%, en morado entre 90 y 94%, en gris entre 80 y 89%, en verde entre 65 y 79% y en azul los inferiores a 65%.

IDENTIDAD AMINOACÍDICA

[illegible]

Figura 53. Matriz de homología nucleotídica (ángulo inferior) e identidad aminoacídica (ángulo superior) de GSTs de clase Mu en *Tetrahymena thermophila*. En color rojo aparecen los porcentajes iguales o superiores a 95%, en morado entre 80 y 94%, en verde entre 65 y 79% y en azul los inferiores a 65%.

Resultados

TtGSTM28	ATGGGCTGT TAAAATTCAACTAGTTTAGTAAATGATATCCAAGCAAAAAATAATGATAACTTGTTTTAGGTTAT
TtGSTM29	ATGGGTTGCTCAAATTCAACTGTTAAGTAAACGATATCCAAGTAAAAATAAAGATAACTTAGTTTTAGGTTAT
TtGSTM28	TGGGGACTTCCATTAAGAGGTCAACCTCTCAGATATATCTTAGAGCTTGCTAACTATCCTTACACAGAACTAAA
TtGSTM29	TGGGGACTTCCATTAAGAGGTCAACCTCTCAGATATATCTTAGAGCTTGCTAACTATCCTTACACAGAACTAAA
TtGSTM28	TACACTCTATCTCAAGCTACTGATTGGTTTGGTAAAGATAAATAAGAACTAGAATTAGATTTCCCAAATCTTCCA
TtGSTM29	TACACTCTATCTCAAGCTACTGATTGGTTTGGTAAAGATAAATAAGAACTAGAATTAGATTTCCCAAATCTTCCA
TtGSTM28	TATCTCATTCATGGTGATTTCTCAATTACAGAACTCTTCTAATATTGCAAACATTTTGATCCAGTTAACAAATTAA
TtGSTM29	TATCTCATTCATGGTGATTTCTCAATTACAGAGTCTTCTAATATTGCAAACATTTTGATCCAGTTAACAAATTAA
TtGSTM28	CAATATCTTCAAGGAGAAGGCTAAGATAAATACAGAGTAAATAACATTAGATATGTATGCGATGAACTGACAGCT
TtGSTM29	CAATATCTTCAAGGAGAAGGCTAAGATAAATACAGAGTAGATAACATTAGATATGTATGCGATGAACTGACAGCT
TtGSTM28	AAAATATTTTCATCAACTCTCTAGAAGGAAGAAGAAAAGAAGAATTAATTAGCACTTAAATCTTCCTAAAATT
TtGSTM29	AAAATATTTTCATCAACTCTCTAGAAGGAGGAAGAAAAGAAGAATCAATTAGAACTTAAATCTTCCTAAAATT
TtGSTM28	CAATAGCTATAAAAGGTATTAGGAAGTTAGACTTCATTCTTCAAGAAATTGACTTTAGCAGACATTTATGCTTAC
TtGSTM29	CAATAGCTCTAAAAGGTATTAGGAAGTTAGACTTCATTCTTCAAGAAATTGACTTTAGCAGACATTTATGCTTAC
TtGSTM28	ACAGCATTGGCCTATTTCAAAAAGACATACTCTATGGAATATCAGCAATTCGCATCAGACTTTGATCCTTTTTTA
TtGSTM29	ACAGCATTGGCCTATTTCAAAAAGACATACTCTAAGGAATATCAGCAATTCGCATCAGACTTTGATCCTTTTTTA
TtGSTM28	AAGAGATTTGAAGAAATTCCTAGAATAAAAAATTATCATCAATCTGAAAGATATAAAAAATTATGA
TtGSTM29	AAGAGATTTGAAGAAATTCCTAGAATAAAAAATTATCATCAATCTGAAAGATATAAAAAATTATGA

Figura 54. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes *TtGSTM28* y *TtGSTM29*. En amarillo se destacan aquellos nucleótidos que son idénticos en ambos genes.

Las proteínas inferidas de los genes *TtGSTs* tienen un tamaño variable, que oscila entre 805 y 165 aminoácidos, aunque la mayor parte de estas enzimas tiene una longitud comprendida entre 200-250 aminoácidos. Consecuentemente, los pesos moleculares de las GSTs putativas de *T. thermophila* son muy variables (90,60-19,77 kDa), aunque la mayoría presenta un tamaño molecular que oscila entre 23 y 29 kDa. Entre las diversas clases de GSTs que posee este ciliado, la menor variabilidad de tamaño y peso molecular lo presentan las GSTs de la clase Omega (Tabla 13). Los porcentajes de identidad en todos los casos son superiores a los porcentajes de homología, debido a que cambios en la secuencia nucleotídica no siempre implican cambios en la secuencia aminoacídica (Figuras 51, 52 y 53). De este modo, entre las TtGSTs de clase Omega, que mostraban una homología en torno al 45 %, existe una identidad aminoacídica superior al 88 % (Figura 51). De forma similar la identidad aminoacídica entre las TtGSTTs es muy elevada (≥ 90 %) excepto para el gen *TtGSTT5* que comparte un 79 % de identidad con el resto de proteínas de la clase Theta (Figura 52).

En la Figura 55, se representa el árbol filogenético que comprende la familia de las 63 putativas GSTs de *T. thermophila*, en la que se puede observar la distribución de las diversas isoformas y su agrupación en clases. Como se puede comprobar, las GSTs de las clases Omega, Zeta y Theta constituyen grupos homogéneos, con derivaciones comunes. Por el contrario, en

la clase Mu, que es la más numerosa ya que cuenta con 47 isoformas, pueden distinguirse al menos 5 grandes grupos, que reúne a isoformas similares con orígenes comunes. Dentro de esta clase, las isoformas TtGSTM44 y TtGSTM45 parecen diferenciarse del resto en cuanto a su posible origen (Figura 55).

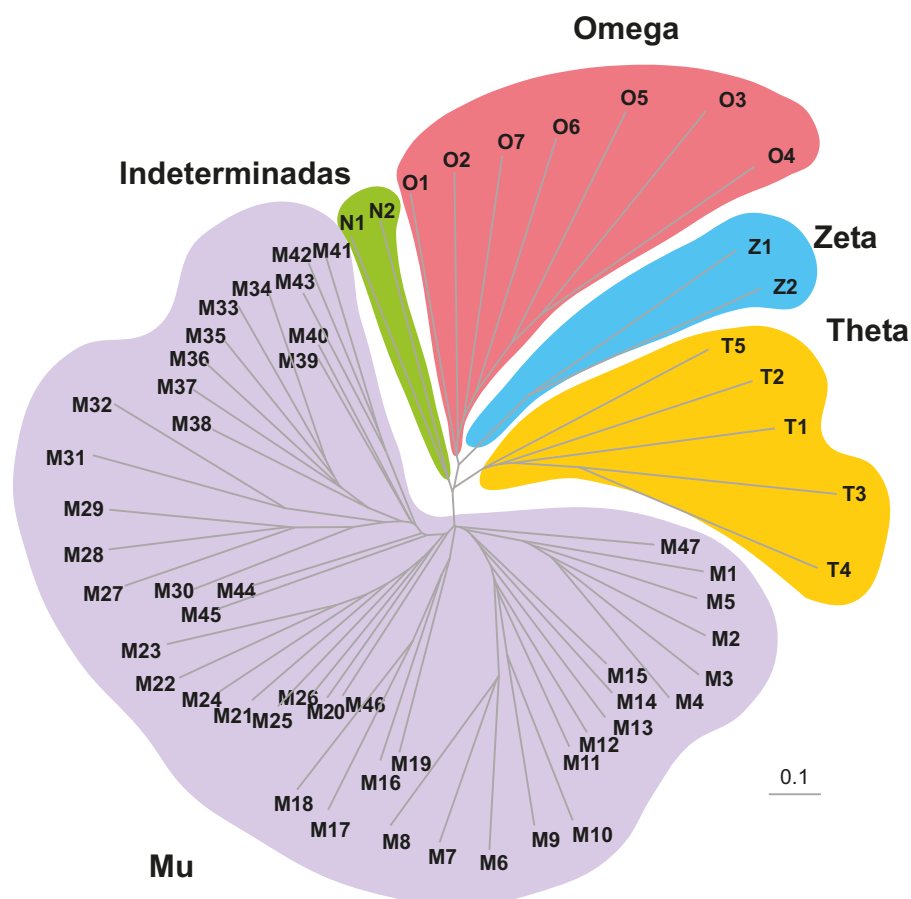


Figura 55. Árbol filogenético de las diferentes clases de TtGSTs de *T. thermophila*. La barra indica el número de sustituciones por sitio

Para comprobar que la inclusión de las GSTs de este ciliado en distintas clases era la correcta, se realizó un árbol filogenético (Figura 56) que incluía algunas isoformas de cada clase (al menos una representante de cada uno de las ramas obtenidas en el árbol de la Figura 55) junto con algunas “GSTs modelo” para cada clase procedentes de diferentes organismos. Se diferencian dos ramas principales, por un lado se encuentran las GSTs más primitivas que incluyen las clases Omega, Zeta y Theta; y por otro lado se agrupan las clases específicas de animales, Alfa, Pi, Sigma y Mu. En todos los casos, las isoformas pertenecientes al ciliado *T. thermophila* se distribuyen en las mismas clases que previamente habíamos asignado. Enzimas GSTs de otros protozoos como las de *Blepharisma* y *Plasmodium* forman grupos independientes, pero dentro de

Resultados

la rama de las clases específicas de animales. Mientras que las dos TtGSTs no clasificadas, no se relacionan con ninguno de los grupos al igual que lo hacen las enzimas de procariotas (*EcGSTB* y *PmGSTB*) (Figura 56). Explorando en el genoma-macronuclear completamente secuenciado del ciliado *P. tetraurelia* hemos encontrado 31 genes homólogos de GSTs, que algunos de ellos se muestran igualmente incluidos en el árbol de la Figura 56.

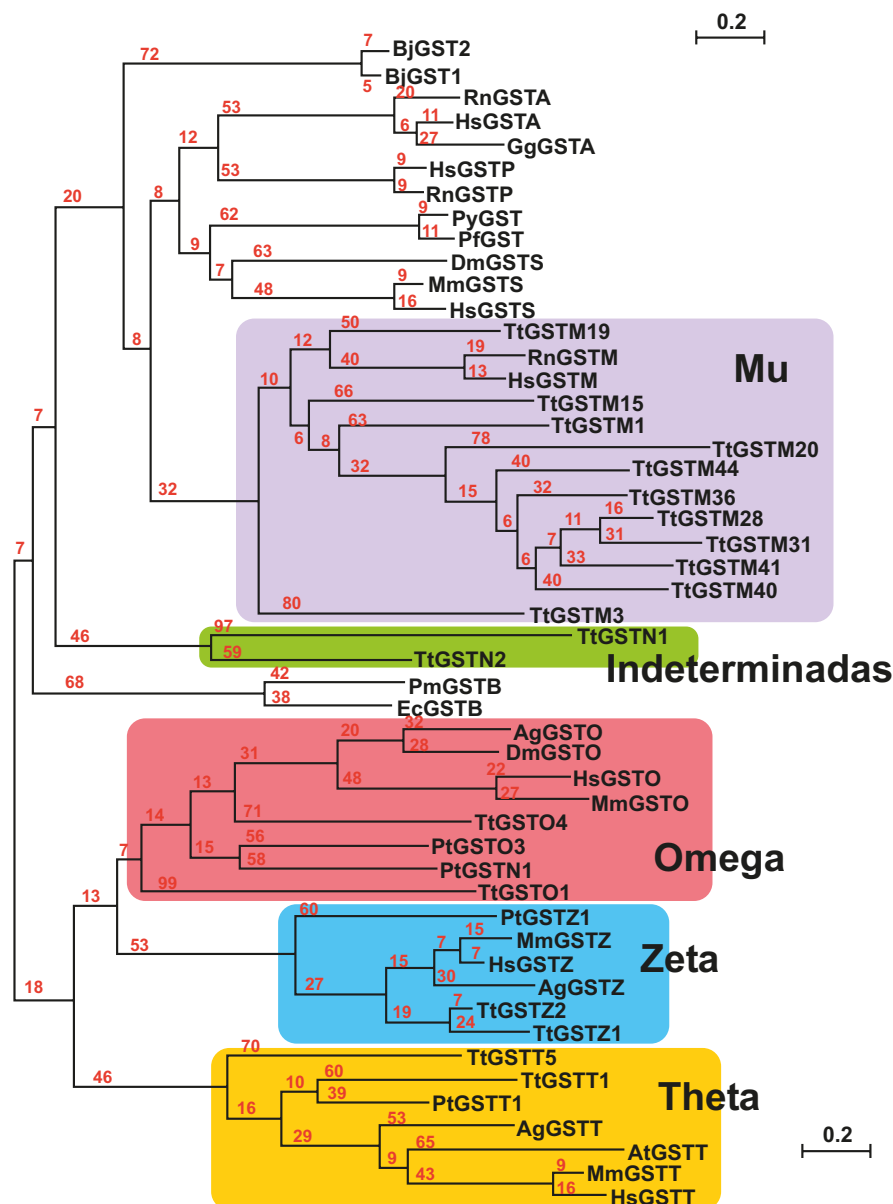


Figura 56. Árbol filogenético en el que se comparan representantes de TtGST de las diferentes clases con GSTs de otros organismo. Ag: Anopheles gambiae, At: Arabidopsis thaliana, Bj: Blepharisma japonicum, Dm: Drosophila melanogaster, Ec: Escherichia coli, Hs: Homo sapiens, Mm: Mus musculus, Pf: Plasmodium falciparum, Pm: Proteus mirabilis, Pt: Paramecium tetraurelia, Py: Plasmodium yoelii, Rn: Rattus norvegicus, Tt: Tetrahymena thermophila. En color rojo se representan los valores de muestreo aleatorio. La barra indica el número de sustituciones por sitio.

Además, también se llevó a cabo un análisis de las estructuras 3D inferidas de las secuencias aminoacídicas de algunas de ellas. En la Figuras 57 y 58, se muestran un ejemplo de estructura 3D de cada una de las clases de GST de *T. thermophila*.

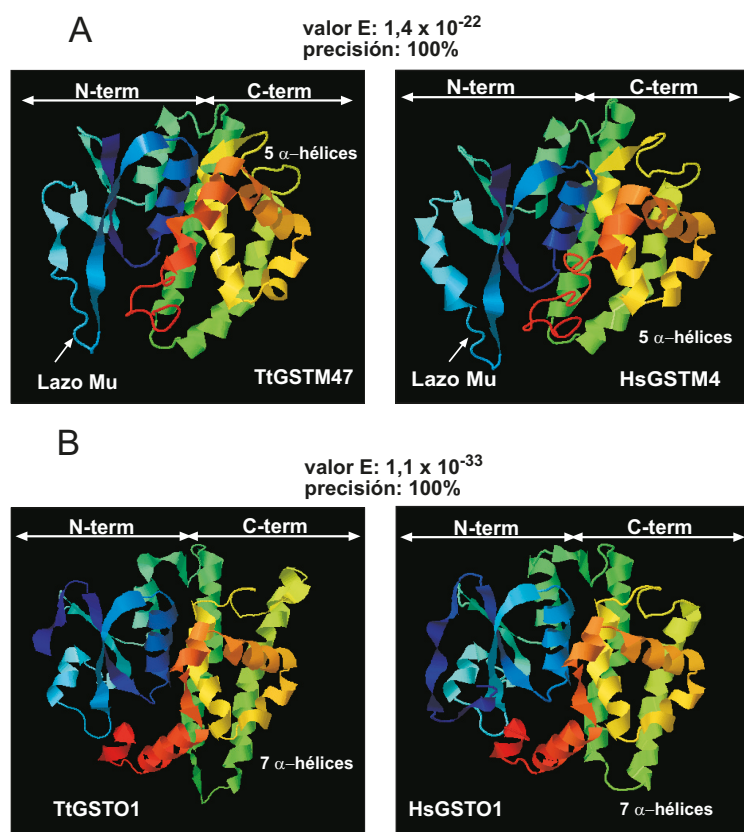


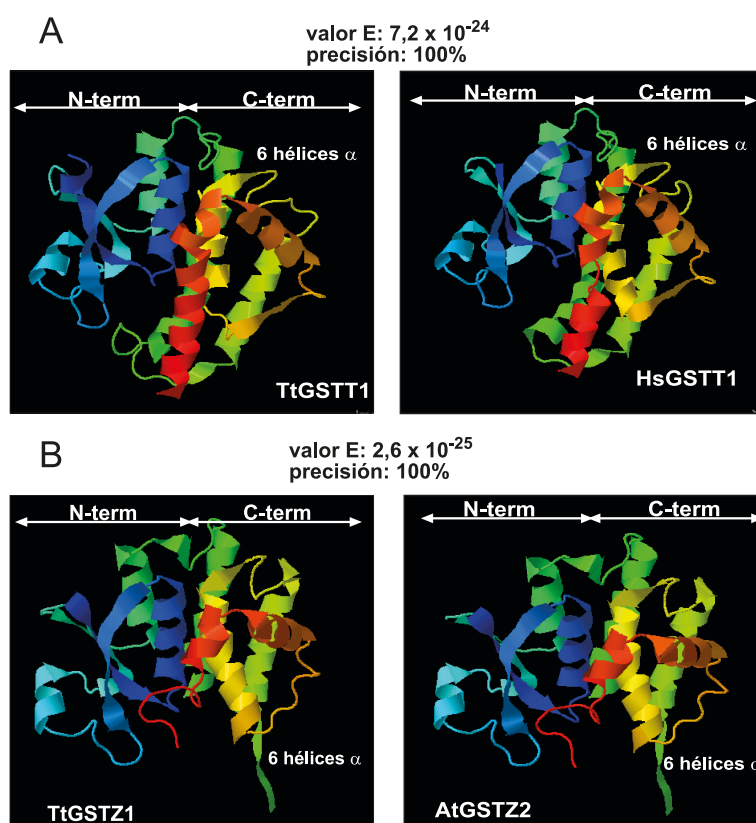
Figura 57. Estructura tridimensional inferida a partir de las secuencias aminoacídicas de las proteínas TtGSTM47 y TtGSTO1. En la parte superior de cada imagen se especifican el valor E (fiabilidad) y la precisión de la estimación y al lado derecho, la imagen de la proteína con la cual se compara. Hs: *Homo sapiens*. N-term: región aminoterminal. C-term: región carboxilo terminal. A: Clase Mu. B: Clase Omega.

La TtGSTM47 (GST de clase Mu) (Figura 57) tiene un dominio-I o N-terminal compuesto de 4 láminas- β y tres α -hélices organizadas según la configuración típica del plegamiento de tiorredoxina ($\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3\beta_4\alpha_3$). En este mismo dominio, entre la lámina β_2 y la hélice α_2 presenta el típico "lazo Mu" (característico de la clase Mu). El dominio-II o C-terminal está constituido por 5 α -hélices y una pequeña lámina- β (β_5) intercalada entre ellas. El análisis comparativo 3D nos muestra que esta estructura (TtGSTM47) presenta un valor de fiabilidad $E=1,4 \times 10^{-22}$ (con una precisión del 100%) al compararla con una GST humana (HsGSTM4). (Figura 57).

Al igual que la representante de la clase Mu, el resto de las GSTs seleccionadas de cada clase, tienen un dominio-I similar a la mayoría de las GSTs citosólicas (4 láminas β y 3 α -hélices en la configuración típica de tiorredoxina), pero se diferencian en el dominio-II.

La TtGSTO1 (Figura 57) tiene un dominio-II constituido por 7 α -hélices y una pequeña lámina β que las separa. Con un valor $E=1,1 \times 10^{-33}$ (con una precisión del 100%) al compararla con la humana (HsGSTO1).

Figura 58. Estructura tridimensional inferida a partir de las secuencias aminoacídicas de las proteínas TtGSTT1 y TtGSTZ1. En la parte superior de cada imagen se especifican el valor E (fiabilidad) y la precisión de la estimación y al lado derecho, la imagen de la proteína con la cual se compara. Hs: *Homo sapiens*. At: *Arabidopsis thaliana*. N-term: región aminoterminal. C-term: región carboxilo terminal. A: Clase Theta. B: Clase Zeta.



La representante de la clase Theta (TtGSTT1) (Figura 58) tiene en su región C-terminal 6 α -hélices, igualmente interrumpidas por una corta lámina β . Esta tiene un valor $E=7,2 \times 10^{-24}$ (100% de precisión) con la humana HsGSTT1.

Y por último, la TtGSTZ1 (Figura 58) tiene un dominio-II formado por 6 α -hélices, también interrumpidas por una lámina β . Un valor $E=2,6 \times 10^{-25}$ (precisión 100%) al compararla proteína AtGSTZ2 de *A. thaliana*.

4.2 Análisis de la expresión por RT-PCR cuantitativa de algunos genes *TtGSTs* seleccionados.

El análisis de la expresión de los diferentes genes codificantes de putativas GSTs presentes en el ciliado *T. thermophila* está bastante limitado por la existencia del elevado grado de homología que presentan sus secuencias nucleotídicas (Figuras 51-54). Este elevado porcentaje de homología que existe entre bastantes genes *TtGSTs* hace muy difícil el diseño de cebadores capaces de discriminar entre estos genes y que pongan de manifiesto de forma inequívoca la expresión exclusiva de uno de ellos. En algunos casos se ha podido conseguir el análisis de un gen independiente, pero en otros casos sabemos que los cebadores se pueden unir a secuencias muy similares de un grupo de genes parecidos, por lo que la expresión medida constituye

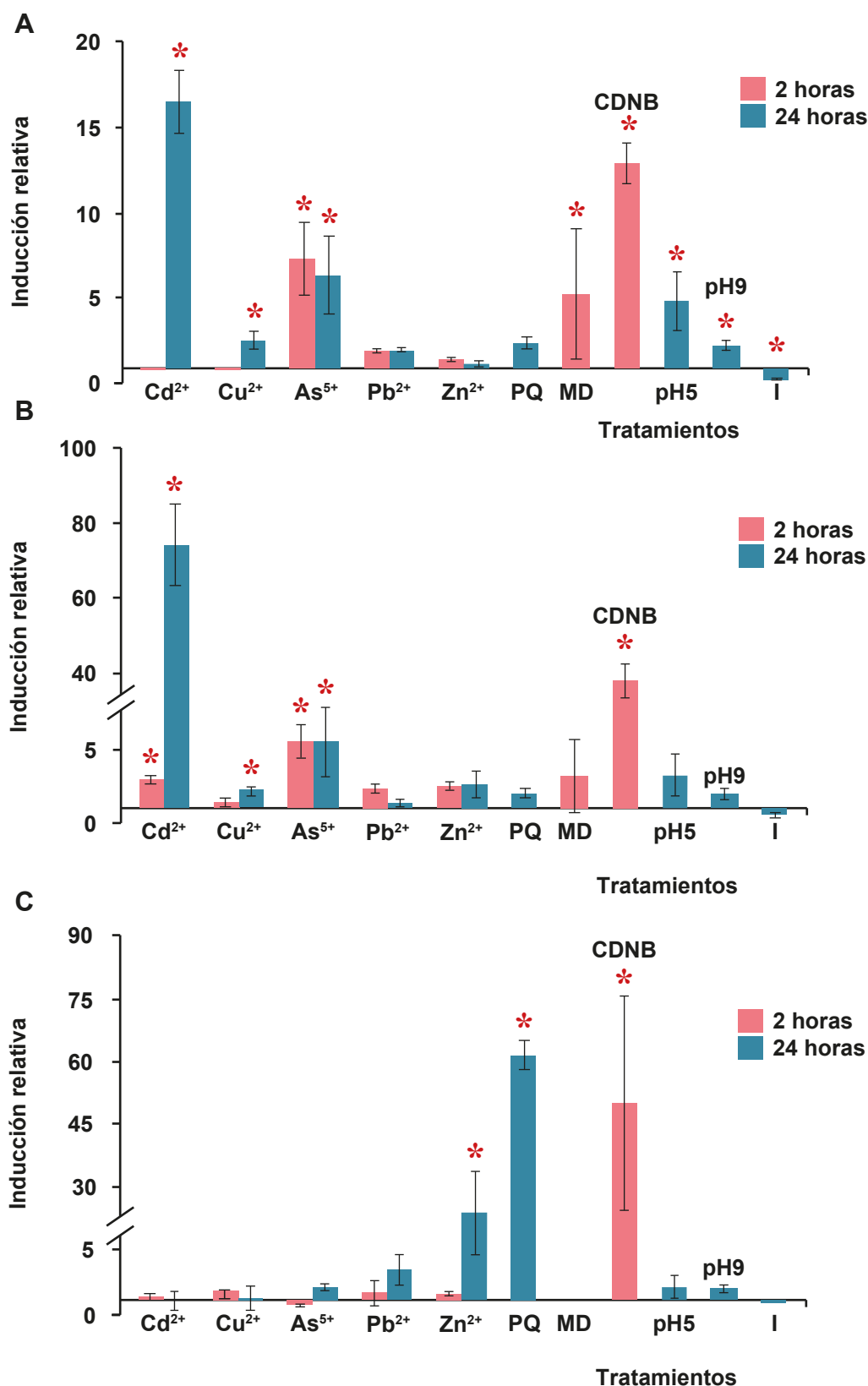


Figura 59. Niveles de inducción relativa de la expresión de los genes *TtGSTM*. A: *TtGSTM3*, B: *TtGSTM4*, C: *TtGSTM9*. Tratamientos: Cd²⁺: 44 μ M, Cu²⁺: 400 μ M, As⁵⁺: 100 μ M, Pb²⁺: 950 μ M, Zn²⁺: 3.500 μ M, PQ: paraquat (7.800 μ M), MD: menadiona (5.000 μ M), CDBN: 2-cloro-dinitrobenzoceno (200 μ M), I: inanición (falta de nutrientes). Los asteriscos señalan los tratamientos que producen efectos significativos sobre la expresión del gen. Datos reflejados en las Tablas 2 A(III) y 3 A(III) del Anexo III.

Resultados

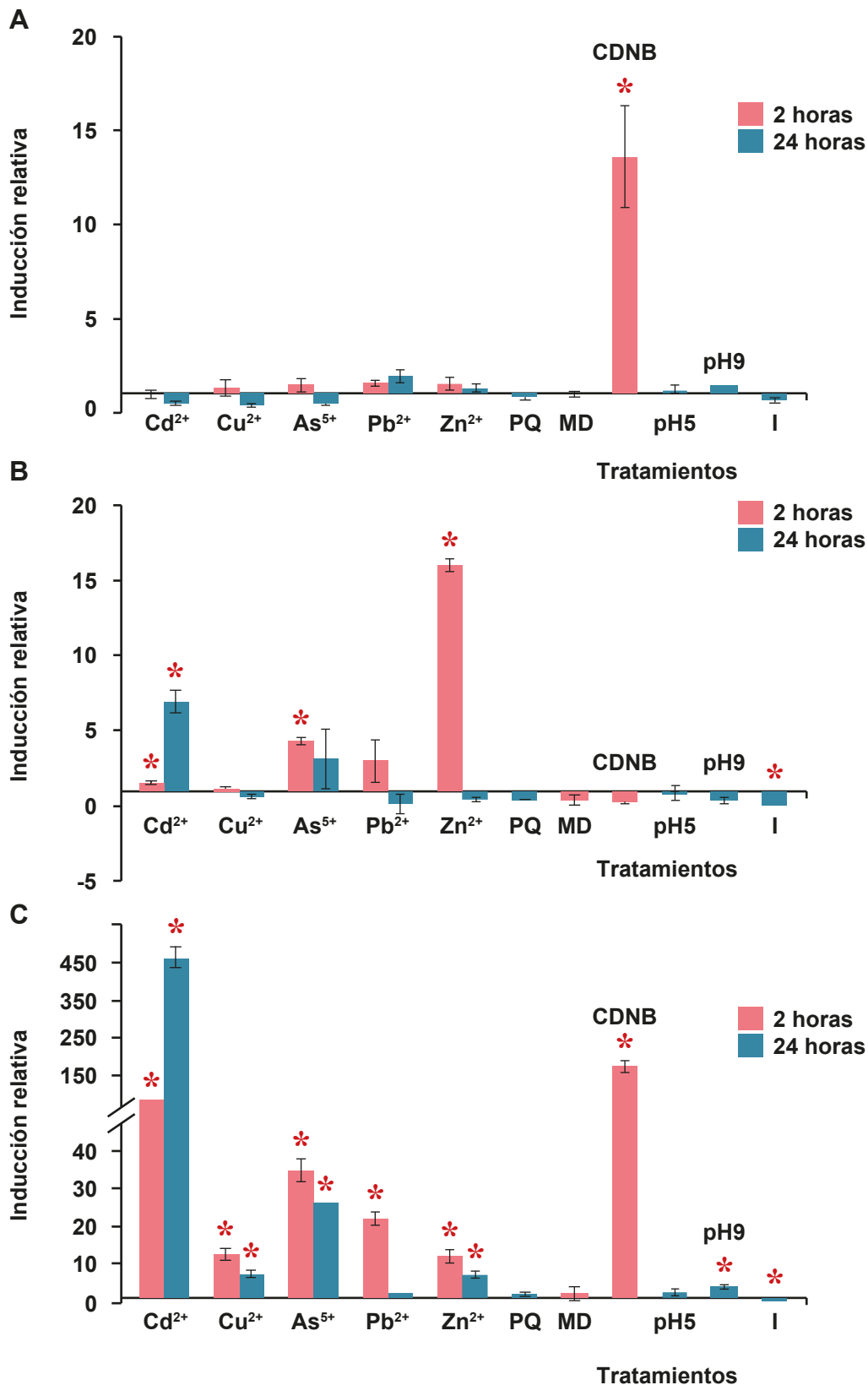


Figura 60. Niveles de inducción relativa de la expresión de los genes *TtGST*. A: *TtGST*15, B: *TtGST*17, C: grupo génico *TtGST*27/28/29. Tratamientos: Cd^{2+} : 44 μ M, Cu^{2+} : 400 μ M, As^{5+} : 100 μ M, Pb^{2+} : 950 μ M, Zn^{2+} : 3.500 μ M, PQ: paraquat (7.800 μ M), MD: menadiona (5.000 μ M), CDNB: 2-cloro-dinitrobenzono (200 μ M), I: inanición (falta de nutrientes). Los asteriscos señalan los tratamientos que producen efectos significativos sobre la expresión del gen. Datos reflejados en las Tablas 3 A(III) y 4 A(III) del Anexo III.

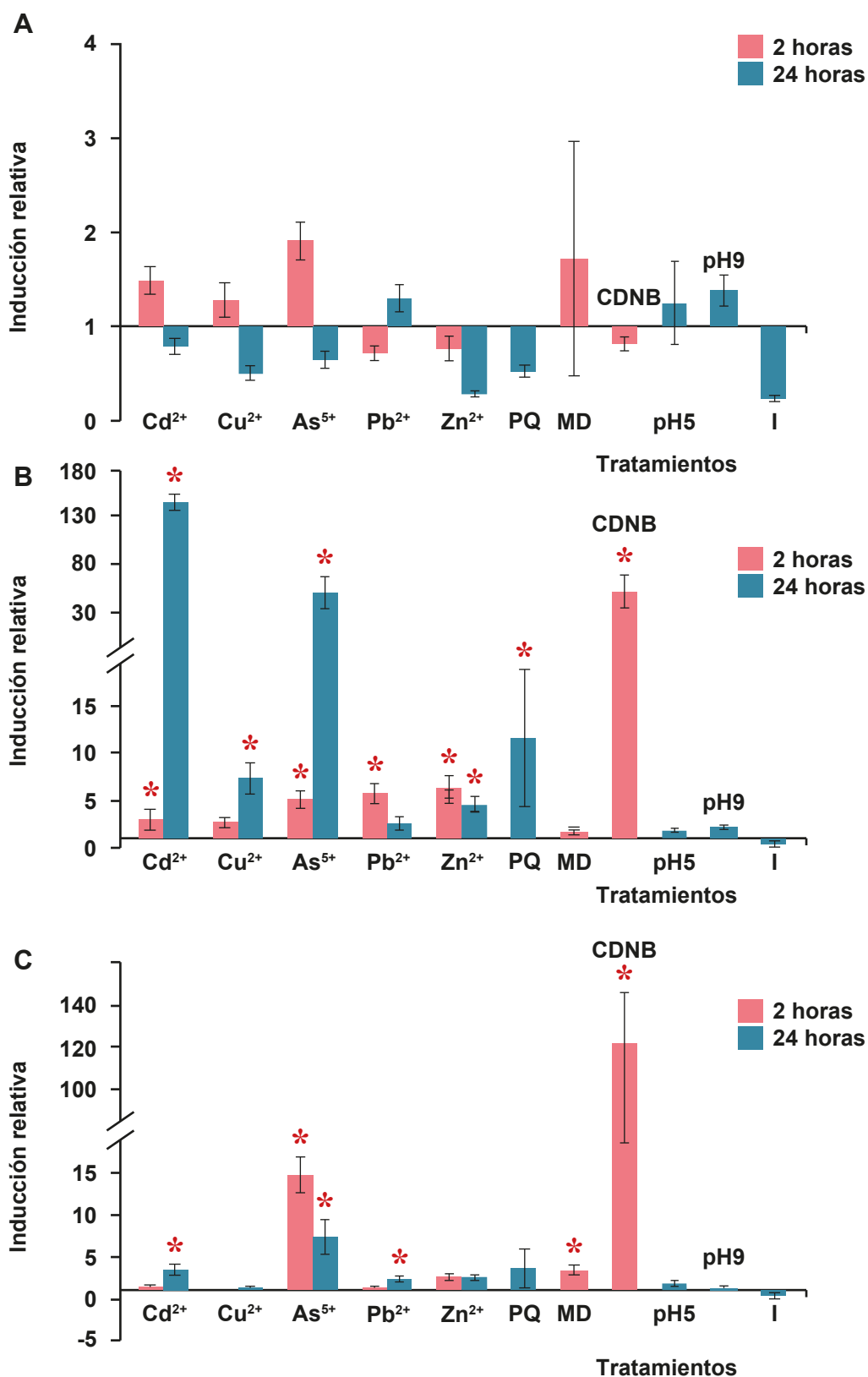


Figura 61. Niveles de inducción relativa de la expresión de los genes *TtGSTM*. A: *TtGSTM40*, B: grupo génico *TtGSTM41/42/43*, C: *TtGSTM46*. Tratamientos: Cd²⁺: 44 µM, Cu²⁺: 400 µM, As⁵⁺: 100µM, Pb²⁺: 950 µM, Zn²⁺: 3.500 µM, PQ: paraquat (7.800 µM), MD: menadiona (5.000 µM), CDNB: 2-cloro-dinitrobenzenceno (200 µM), I: inanición (falta de nutrientes). Los asteriscos señalan los tratamientos que producen efectos significativos sobre la expresión del gen. Datos reflejados en las Tablas 5 A(III) y 6 A(III) del Anexo III.

Resultados

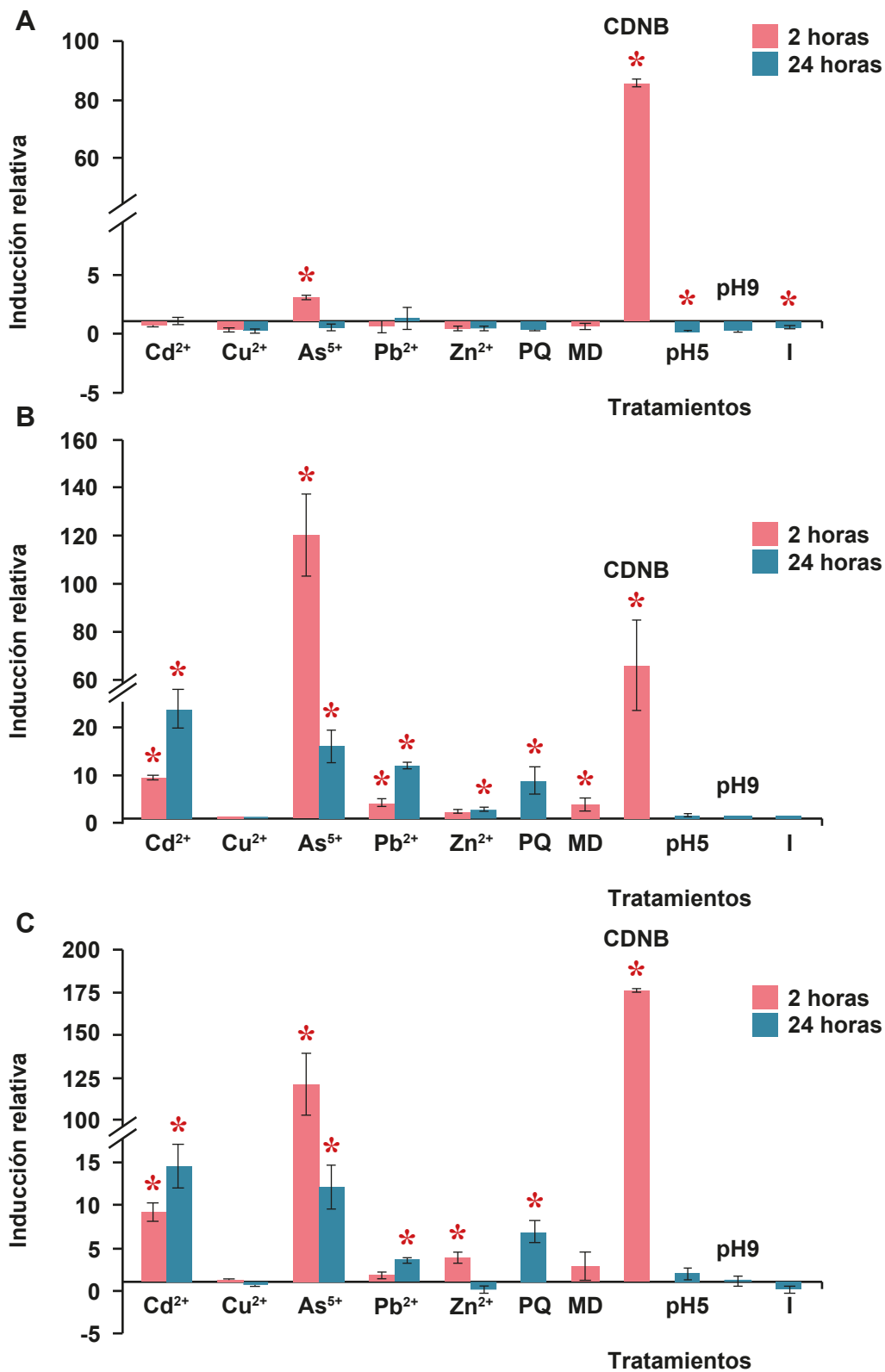


Figura 62. Niveles de inducción relativa de la expresión de los genes *TtGST*. A: *TtGSTM47*, B: *TtGSTO1*, C: *TtGSTO6*. Tratamientos: Cd²⁺: 44 µM, Cu²⁺: 400 µM, As⁵⁺: 100µM, Pb²⁺: 950 µM, Zn²⁺: 3.500 µM, PQ: paraquat (7.800 µM), MD: menadiona (5.000 µM), CDNB: 2-cloro-dinitrobenzenceno (200 µM), I: inanición (falta de nutrientes). Los asteriscos señalan los tratamientos que producen efectos significativos sobre la expresión del gen. Datos reflejados en las Tablas 6 A(III) y 7 A(III) del Anexo III.

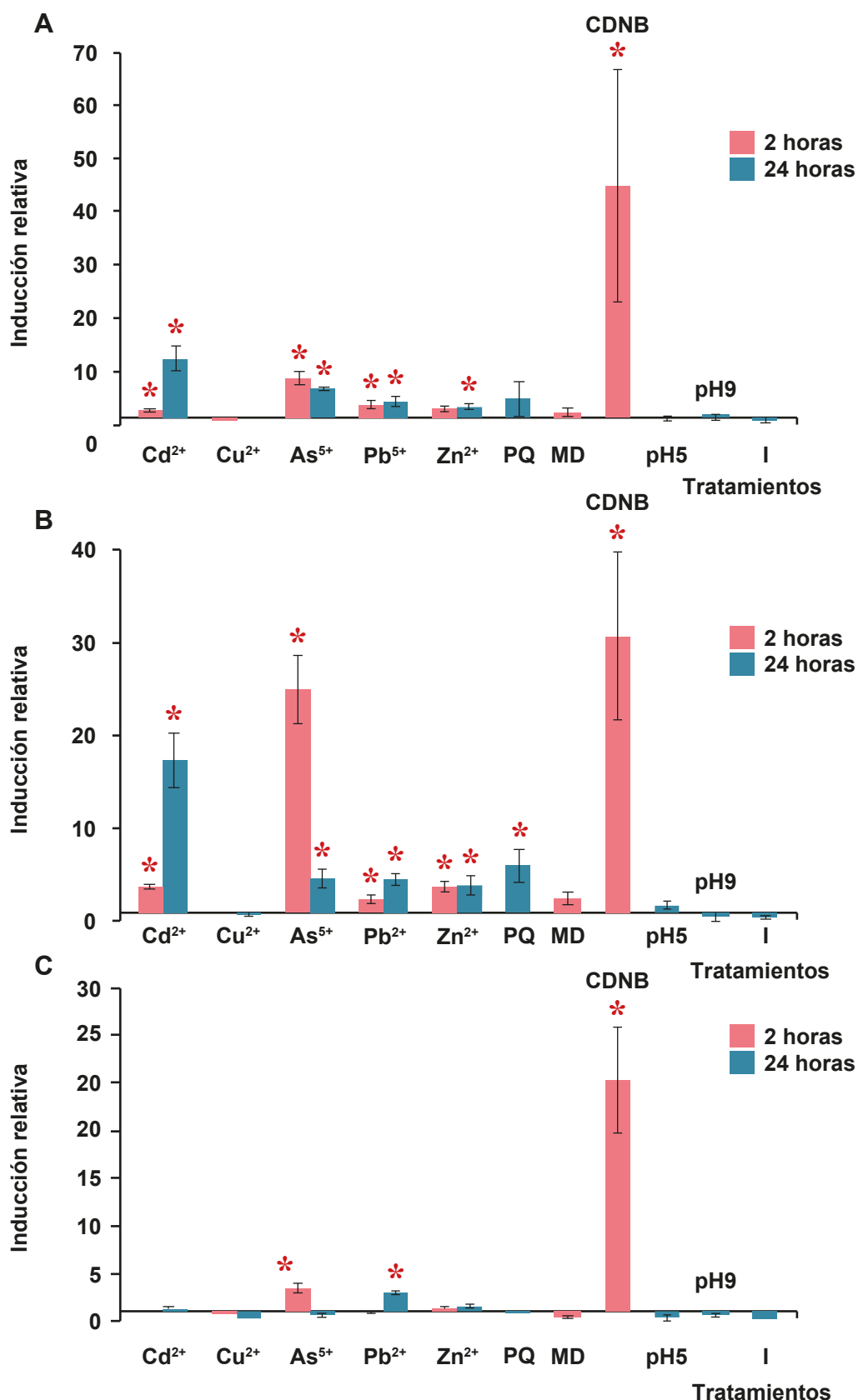


Figura 63. Niveles de inducción relativa de la expresión de los genes *TtGST*. A: *TtGSTT1*, B: *TtGSTT3*, C: *TtGSTZ1*. Tratamientos: Cd²⁺: 44 µM, Cu²⁺: 400 µM, As⁵⁺: 100µM, Pb²⁺: 950 µM, Zn²⁺: 3.500 µM, PQ: paraquat (7.800 µM), MD: menadiona (5.000 µM), CDNB: 2-cloro-dinitrobenzono (200 µM), I: inanición (falta de nutrientes). Los asteriscos señalan los tratamientos que producen efectos significativos sobre la expresión del gen. Datos reflejados en las Tablas 8 A(III) y 9 A(III) del Anexo III

Resultados

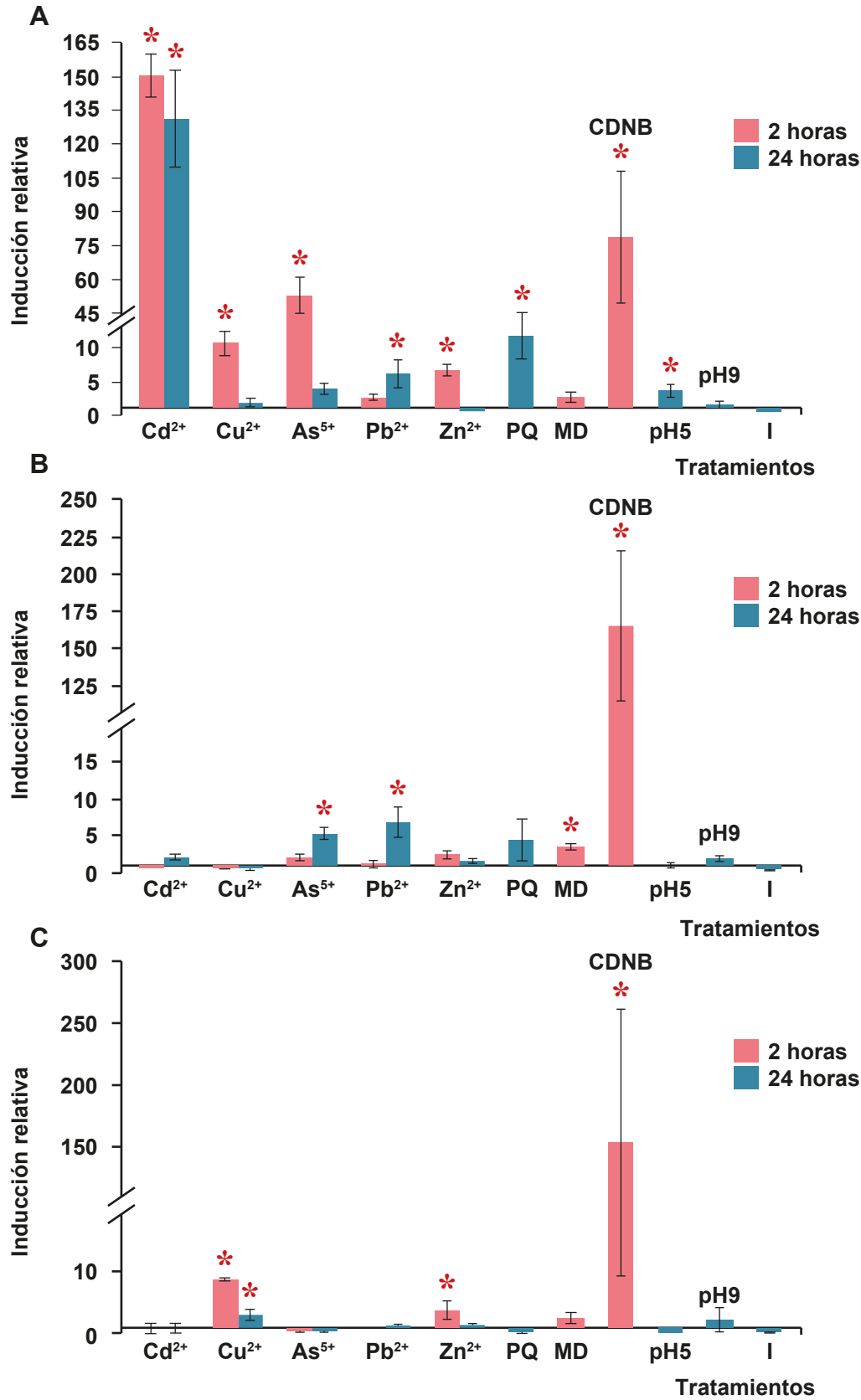


Figura 64. Niveles de inducción relativa de la expresión de los genes *TtGST*. A: *TtGSTZ2*, B: *TtGSTN1*, C: *TtGSTN2*. Tratamientos: Cd²⁺: 44 µM, Cu²⁺: 400 µM, As⁵⁺: 100µM, Pb²⁺: 950 µM, Zn²⁺: 3.500 µM, PQ: paraquat (7.800 µM), MD: menadiona (5.000 µM), CDNB: 2-cloro-dinitrobenzenceno (200 µM), I: inanición (falta de nutrientes). Los asteriscos señalan los tratamientos que producen efectos significativos sobre la expresión del gen. Datos reflejados en las Tablas 9 A(III) y 10 A(III) del Anexo III

la suma de las expresiones de ellos o de algunos de ellos (expresión de agrupaciones génicas parálogas muy similares). Así, por ejemplo, dentro de la clase Mu se ha podido analizar la expresión individual de los genes *TtGSTM3*, *TtGSTM4*, *TtGSTM9*, *TtGSTM15*, *TtGSTM17*, *TtGSTM40*, *TtGSTM46* y *TtGSTM47*. Además, también se ha analizado la presumible expresión conjunta de dos grupos de genes indistinguibles por RT-PCR; un *cluster* o agrupación que se compone de las secuencias *TtGSTM27*, *TtGSTM28* y *TtGSTM29*, con homologías entre ellos muy altas (Figura 53) y localizados en la misma región cromosómica (Figura 50) y otro representado por *TtGSTM41*, *TtGSTM42* y *TtGSTM43*, con homologías altas (Figura 53) y agrupados en la misma región cromosómica (Figura 50). Todo esto hace un total de 14 genes de la clase *TtGSTM* (un 29 % del total de isoformas encontradas). Para el resto de las clases de genes *TtGSTs* se ha podido analizar representantes individuales, así por ejemplo; 2 de la clase Theta (*TtGSTT1* y *TtGSTTT3*) (un 40 %), 2 de la clase Omega (*TtGSTO1* y *TtGSTO6*) (un 28 %), los dos de la clase Zeta y los dos de la clase "N" (indeterminada). Por lo tanto, se han analizado, por RT-PCR cuantitativa, la expresión de un total de 22 (un 47 %) de los genes *TtGSTs*. Los datos de estos análisis de expresión bajo el estrés de metales pesados, estrés oxidativo y otros agentes estresantes, se representan en diferentes histogramas (Figuras 59-64), y los datos numéricos y estadísticos se muestran en diferentes Tablas 2-9A(III) del Anexo III.

En general, la expresión de los genes *TtGSTM3* y *TtGSTM4* (cuyas ORFs completas se muestran en las Figuras 2A(II) y 3A(II) del Anexo II) presentan unos perfiles similares bajo la acción de los diferentes agentes estresantes, aunque los valores de inducción relativa son diferentes (Figura 59A, Tabla 2A(III) del Anexo III). Ambos genes son inducidos por Cd^{2+} , Cu^{2+} (24 h) y As^{5+} , pero no por Pb^{2+} o Zn^{2+} (Tabla 2A(III) del Anexo III). Los niveles de inducción por el Cd^{2+} son diferentes, ya que el *TtGSTM4* parece que se induce más y antes (a las 2 h de tratamiento), respecto del *TtGSTM3* (Tabla 2A(III) del Anexo III). Pero ambos se inducen a niveles similares con el Cu^{2+} o el As^{5+} . Entre los agentes que inducen estrés oxidativo, la MD sólo induce significativamente la expresión del gen *TtGSTM3*, mientras el CDNB (inductor universal de genes *GSTs*) induce significativamente ($p < 0,05$) la expresión de ambos genes, sobretodo (38 veces) los niveles de *TtGSTM4* (Figura 59A y 59B, Tabla 2A(III) del Anexo III). Tanto el pH ácido como básico sólo incrementan la expresión del gen *TtGSTM3*. La inanición (24 h) reprime los niveles basales de expresión para ambos genes, y lo hace significativamente con el gen *TtGSTM3* (Tabla 2A(III) del Anexo III).

El gen *TtGSTM9* se induce sólo con el Zn^{2+} (24 h) entre los metales pesados utilizados en este estudio (Figura 59C, Tabla 3A(III) del Anexo III). Y con respecto al estrés oxidativo, responde considerablemente al PQ como al inductor universal de genes *GSTs* (CDNB). La inducción de

la expresión del gen *TtGSTM15* (Figura 5A(II) del Anexo II) parece ser mucho más exclusiva, ya que sólo se expresa significativamente bajo la presencia de CDNB (inductor universal de genes GSTs) (Figura 60A, Tabla 3A(III) del Anexo III). El gen *TtGSTM17* (Figura 6A(II) del Anexo II) se expresa con Cd^{2+} , As^{5+} y Zn^{2+} (2 h) (Figura 60B, Tabla 4A(III) del Anexo III), y se reprime o alcanza valores similares a los basales con la mayoría del resto de agentes estresantes (incluidos algunos metales, como el Cu^{2+} y el Pb^{2+}), esta represión es significativa cuando se somete al estrés por inanición (24 h) (Tabla 4A(III) del Anexo III).

La agrupación de genes parálogos (localizados en la misma región cromosómica) (Figura 52) *TtGSTM27/28/29* (Figuras 7A(II), 8A(II) y 9A(II) del Anexo II) presenta una expresión conjunta (probablemente suma de expresiones individuales) con niveles, en general, más elevados y con inducción por un mayor número de agentes estresantes que en el caso de genes individuales. Son fuertemente inducidos por todos los metales pesados, aunque son el Cu^{2+} y el Zn^{2+} los que los induce con un menor nivel de expresión. Son, igualmente, fuertemente inducidos (~165 veces) por el compuesto CDNB. Los agentes inductores de estrés oxidativo (PQ y MD) no inducen estos genes, y la inanición (24 h) produce una represión significativa respecto de los niveles basales (Figura 60C, Tabla 4A(III) del Anexo III).

El gen *TtGSTM40* (Figura 10A(II) del Anexo II), no parece que se induzca con los metales y bajo las condiciones de estrés utilizadas en este estudio, y, al igual que en casos previos de otros genes *TtGSTMs*, la inanición reprime significativamente el gen (Figura 61A, Tabla 5A(III) del Anexo III).

Al igual que en casos anteriores,, los genes *TtGSTM41/42/43* (Figuras 11A(II), 12A(II) y 13A(II) del Anexo II), han tenido que ser estudiados conjuntamente, ante la imposibilidad de poderlos distinguir a nivel de la secuencia nucleotídica. Estos tres genes están localizados en la misma región cromosómica (Figura 50) y su expresión es inducida por todos los metales utilizados, aunque, de nuevo, son el Cu^{2+} y el Zn^{2+} los que los inducen a un nivel menor. El PQ induce todos o, al menos, uno de estos tres genes, y el CDNB también lo hace (Figura 61B, Tabla 5A(III) del Anexo III). El gen *TtGSTM46* (Figura 14A(II) del Anexo II) es inducible por Cd^{2+} , As^{5+} y Pb^{2+} , y no por Cu^{2+} o Zn^{2+} (Figura 62C, Tabla 6A(III) del Anexo III). También es inducible por la MD y sobre todo (~108 veces) por el compuesto CDNB (Tabla 6A(III) del Anexo III).

El último gen de la clase Mu que se ha analizado es el *TtGSTM47* (Figura 15A(II) del Anexo II). Este gen es pobremente inducible (~3 veces) por As^{5+} (2 h) (Figura 62, Tabla 6A(III) del Anexo III), y no parece que sea inducible por el resto de los metales utilizados (ni en tratamientos cortos ni prolongados). Sí es inducible por el compuesto CDNB (~85 veces), sin embargo es significativamente reprimido por pH ácido e inanición (Tabla 6A(III) del Anexo III).

Con respecto a la clase Omega, de las siete isoformas existentes en *T. thermophila* se han analizado dos de ellas; *TtGSTO1* y *TtGSTO6* (Figuras 16A(II) y 17A(II) del Anexo II). Ambos genes presentan patrones de inducción similares con algunas pequeñas diferencias. En cuanto a los metales pesados, ambos genes son inducibles por Cd^{2+} y As^{5+} fundamentalmente, pero también por Pb^{2+} y Zn^{2+} , pero ninguno de los dos es inducible por Cu^{2+} (Figuras 62B y 62C, Tabla 7A(III) del Anexo III). Ambos son inducibles por PQ, pero sólo el *TtGSTO1* moderadamente por MD. Y el compuesto CDNB induce significativamente a ambos, aunque con diferentes niveles de inducción. El estrés por pH o la inanición no ejercen ningún efecto inductor significativo (>2 veces) sobre estos genes (Tabla 7A(III) del Anexo III).

De los cinco genes de la clase Theta, se han estudiado dos; *TtGSTT1* y *TtGSTT3* (Figuras 18A(II) y 19A(II) del Anexo II). Ambos, también presentan patrones de inducción bastante similares, aunque cuantitativamente diferentes. El Cd^{2+} , As^{5+} y Pb^{2+} inducen significativamente ambos. El Zn^{2+} induce, tras exposiciones cortas (2 h) y prolongadas (24 h), al gen *TtGSTT3*, pero el *TtGSTT1* sólo es inducible pobremente por Zn^{2+} tras 24 h de tratamiento y no son inducibles por Cu^{2+} (Figuras 63A y 63B, Tabla 8A(III) del Anexo III). El PQ sólo induce al gen *TtGSTT3*, y ambos son inducibles por CDNB (Tabla 8A(III) del Anexo III).

De la clase Zeta, se han estudiado ambos; *TtGSTZ1* y *TtGSTZ2* (Figuras 20A(II) y 21A(II) del Anexo II), los cuales presentan perfiles de inducción muy diferentes, aunque se encuentran localizados en el mismo brazo cromosómico (4L) (Figura 50). El gen *TtGSTZ1* es sólo pobremente inducido por As^{5+} y Pb^{2+} (tras 2 y 24 h de exposición al metal, respectivamente), y no por el resto de los metales. Sin embargo, el gen *TtGSTZ2* es fuertemente inducido por Cd^{2+} y As^{5+} , y también, a niveles menores, por Cu^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} . El PQ sólo induce al *TtGSTZ2*, y el CDNB induce a ambos. El pH 5 sólo induce pobremente al *TtGSTZ2* (Figuras F63C y 64A, Tabla 9A(III) del Anexo III).

Por último, también se analizaron los dos genes codificantes de putativas GSTs, pero que no son clasificables en clases de GSTs conocidas, y que hemos denominado "N" (Figuras 22A(II) y 23A(II) del Anexo II). Ambos son fuertemente inducibles por CDNB. El gen *TtGSTN1* es inducible por As^{5+} , Pb^{2+} (tras 24 h de exposición), mientras que el *TtGSTN2* es inducible por Cu^{2+} y Zn^{2+} (principalmente tras 2 h de exposición). El *TtGSTN1* es pobremente inducible por MD (Figuras 64B y 64C, Tabla 10A(III) del Anexo III).

5. ANÁLISIS DE LOS GENES HOMÓLOGOS DE TIORREDOXINA (TrxR) Y GLUTATIÓN REDUCTASAS (GR) DE *T. thermophila*.

5.1 Análisis *in silico*.

En el genoma macronuclear del protozoo ciliado *T. thermophila* hemos localizado 6 genes codificantes de proteínas con dominio de flavoproteínas nucleótido de pirimidina-disulfuro óxidoreductasas, y que parecen ser ortólogos pertenecientes a la familia de tiorredoxinas (TrxR) y glutatión reductasas (GR) (Tabla 14). Como se detalla en la Introducción, ambas enzimas, tiorredoxina y glutatión reductasas, son semejantes en cuanto a dominios estructurales, con excepción de un segundo centro activo, que aparece en las TrxRs formado por dos cisteínas consecutivas en el extremo C-terminal de la proteína. En la Tabla 14, se muestran algunas de las características de los 5 genes codificantes para posibles ortólogos TrxR, que se han denominado *TtTrxR1-5*, junto con el único gen codificante para una putativa GR (denominado *TtGR1*). Todos estos genes presentan un número considerable de intrones, localizándose en el brazo derecho del cromosoma 1 (1R) ó 3 (3R) (Tabla 14). Las secuencias de las ORFs completas de los genes *TtTrxR1-5* se muestran en las Figuras 24A(II) – 28A(II) del Anexo II, mientras que la secuencia del gen *TtGR1* se muestra en la Figura 29A(II) del Anexo II.

Gen	Denominación ¹	Longitud (pb)	Intrones	Proteína (aa)	Masa molecular	CR	Región cromosómica
<i>TtTrxR1</i>	TTHERM_00047660	2.136	5	489	53,89	3R	scf_8254659
<i>TtTrxR2</i>	TTHERM_00142420	1.637	2	485	53,80	1R	scf_8254747
<i>TtTrxR3</i>	TTHERM_00486500	2.468	3	638	73,12	1R	scf_8254527
<i>TtTrxR4</i>	TTHERM_00823430	2.385	8	588	65,74	3R	scf_8254397
<i>TtTrxR5</i>	TTHERM_00723630	9.171 (1.569) ⁺	8	2.387 (523) ⁺	278,71 (58,80) ⁺	1R	scf_8254362
<i>TtGR1</i>	TTHERM_01222600	2.103	4	486	53,83	1R	scf_8253899

Tabla 14. Algunas características de los genes codificantes de posibles proteínas ortólogas con dominios flavoproteínas nucleótido de pirimidina oxidoreductasa presentes en *T. thermophila*. TtTrxR: tiorredoxina reductasa, TtGR: glutatión reductasa. ¹: Denominación según la web del genoma macronuclear de *T. thermophila* (www.ciliate.org). CR: localización cromosómica. 1R: brazo derecho del cromosoma 1, 3R: brazo derecho del cromosoma 3, Nd: sin determinar. ⁺: entre paréntesis se indica la longitud de la ORF, de la proteína y su masa molecular inferida del TtTrxR5 liberada del resto de secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del mismo.

En la Figura 65 se muestra la distribución de dominios de los genes potencialmente codificantes de glutatión y thiorredoxina reductasas. La proteína codificada por el gen denominado *TTHERM_00142420* (o *TtTrxR2*) posee los dominios típicos de las TrxRs, incluyendo sus dos cisteínas terminales. Por lo tanto, consideramos que esta secuencia corresponde, muy probablemente, a un gen codificante para una thiorredoxina reductasa (Figura 65). El gen *TTHERM_01222600* (o *TtGR1*) puede codificar una proteína con los mismos dominios, pero carente de la pareja de cisteínas, por lo tanto pensamos que se trata de un gen codificante de una actividad GR (Figura 65). Las posibles funciones de los otros 4 genes restantes es más compleja. Por un lado, en los genes *TTHERM_00047660* (*TtTrxR1*), *TTHERM_00486500* (*TtTrxR3*) y *TTHERM_00823430* (*TtTrxR4*), el último aminoácido descrito en los bancos de datos (www.ciliate.org) es una cisteína. Sin embargo, si analizamos la región 3'UTR (no codificante) de estos genes nos encontramos con posibles secuencias SECIS (codificantes para selenocisteína), de tal forma que el codón considerado en el banco de datos como codón *STOP*, codificaría con mucha probabilidad para un residuo de

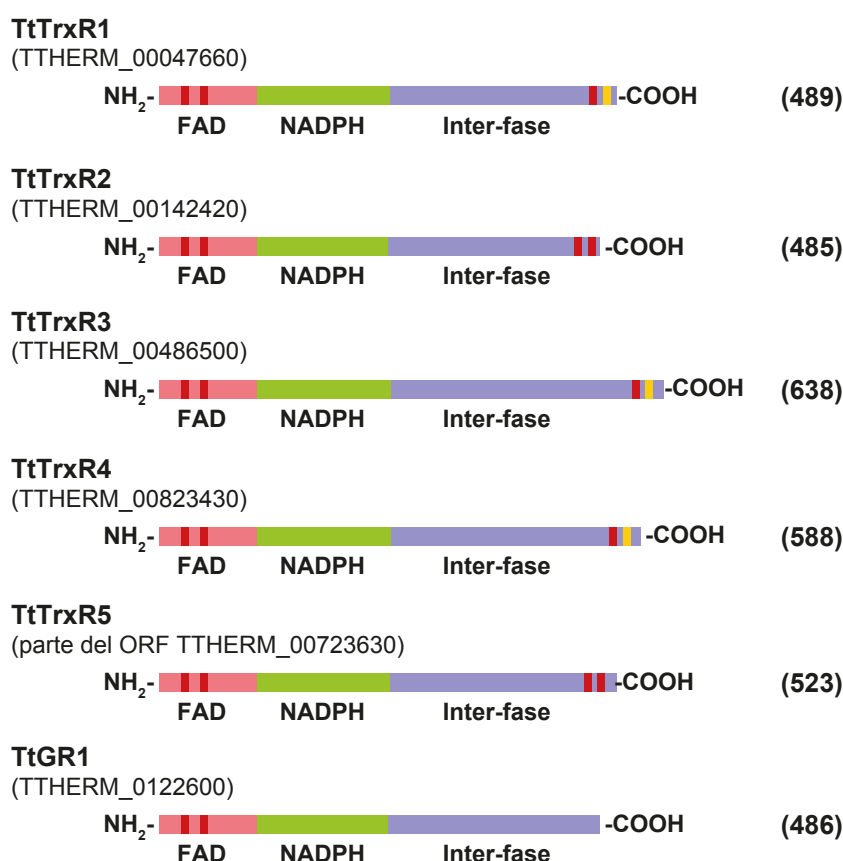


Figura 65. Distribución de los diferentes dominios que se han identificado en los genes codificantes para posibles GR y TrxRs en *Tetrahymena thermophila*. En color rosa se muestra el dominio FAD (flavo-proteína), en verde el dominio de reconocimiento para NADPH, y en malva la región carboxilo terminal. Las barras de color rojo indican las cisteínas y las amarillas las selenocisteínas. A la derecha entre paréntesis se indica el número de aminoácidos que conforman las proteínas.

Resultados

selenocisteína (U), el codón siguiente codifica para otro aminoácido y el siguiente es el codón *STOP* definitivo (Figuras 24A, 26A y 27A del Anexo II). Las características de las secuencias SECIS de estos genes se ilustran en las Figuras 24A(II), 26A(II) y 27A(II) del Anexo II y en la Figura 66, en donde se muestran las estructuras secundarias de estas regiones. Considerando tanto la conformación de estos genes, con los dominios característicos de TrxRs, como la aparición de la pareja cisteína-selenocisteína, suponemos, que estos genes codifican muy probablemente TrxRs, que en la mayoría de los seres vivos son selenoproteínas, a diferencia de las glutatión reductasas, que no tienen selenio.

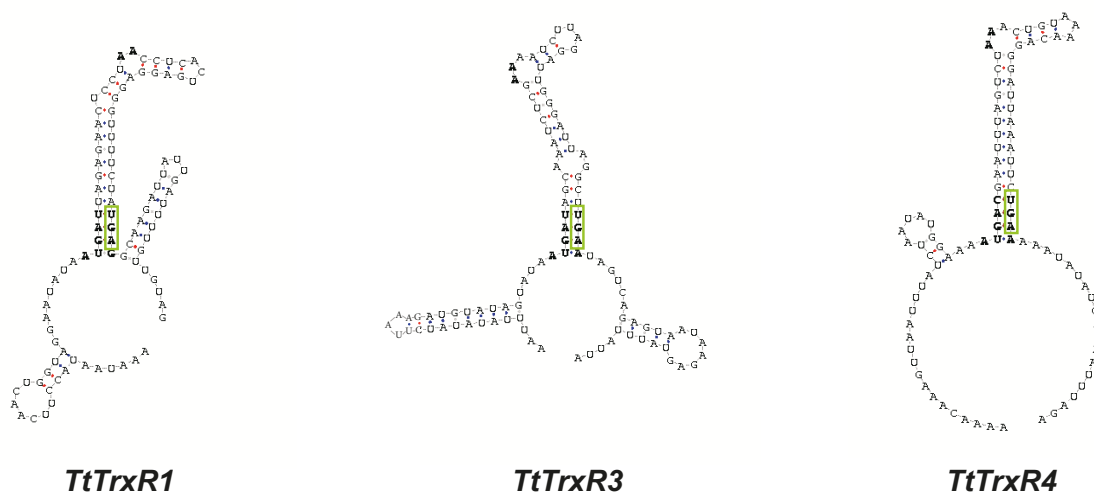


Figura 66. Modelo de estructuras secundarias de las secuencias SECIS, responsables de la traducción del aminoácido selenocisteína, presentes en las secuencias 3'UTR de los genes *TtTrxR1*, *TtTrxR3* y *TtTrxR4*. Estas secuencias provocan que el codón UGA (en la figura indicado dentro de un recuadro verde), unico codon STOP en ciliados, se traduzca como selenocisteína.

Finalmente, nos queda por analizar aún un último gen *TtTrxR*, el *TtTHERM_00723630* (*TtTrxR5*), el cual teóricamente codificaría una proteína de 2.387 aminoácidos (Tabla 13), tamaño que es demasiado grande para una TrxR o GR. A este respecto hay que destacar que, entre los aminoácidos 1.016 y 1.529 (Figuras 28A(II) del Anexo II y Figura 67) se localiza una secuencia de 523 aminoácidos con estructura típica de TrxR, es decir, con los dominios de unión al FAD y al NADPH y un segundo centro activo, formado por la pareja de cisteínas en las posiciones 1.524 y 1.525 (Figura 65). Tras la realización de un BLAST, se comprobó que las secuencias comprendidas entre los aminoácidos 1-1.015 y 1.530-2.387 (regiones que flanquean la secuencia antes descrita de 486 aa) no presentaban homología con ninguna proteína de *Tetrahymena* anteriormente descrita. La secuencia, libre de intrones, que comprende los 523 aminoácidos (dentro de la secuencia de 2.387 aa) es la que hemos denominado como *TtTrxR5* (Figura 67).

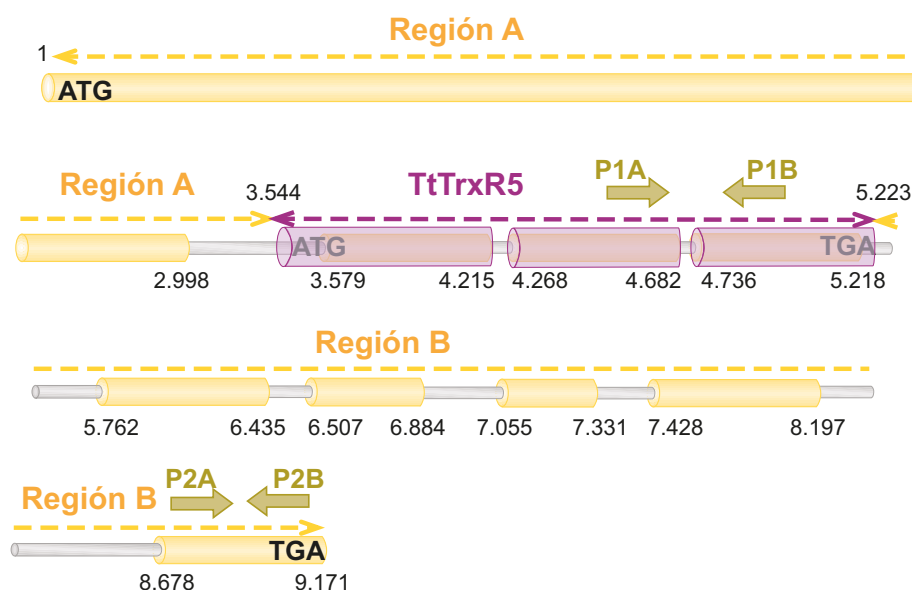


Figura 67. Representación esquemática de los 9.171 nucleótidos de la ORF TTHERM_00723630 (TtTrxR5). Los tubos de color amarillo representan lo exones y los tubos grises de inferior diámetro muestran los intrones. Las regiones A y B (en amarillo) no presentan homología con otros genes descritos, ni se han localizado otros posibles ORFs que codifiquen para proteínas que muestren homología con otras anteriormente descritas. La región representada en color morado y que muestra los dominos típicos de las proteínas TrxRs, está localizada desde una región intrónica del ORF TTHERM_00723630 y es la que hemos denominado gen *TtTrxR5* que a su vez contiene 2 intrones. Las flechas de color verde representan la localización de los cebadores utilizados para el estudio de la expresión por RT-PCR cuantitativa, P1A: TtTrxR5A, P1B: TtTrxR5B, P2A: TTHERM_00723630A, P2B: TTHERM_00723630B (Tabla 10).

Existe un único gen ortólogo similar a GR en *T. thermophila*, que hemos denominado *TtGR1* (Figura 29A(II) del Anexo II), que podría codificar la enzima responsable de la reducción de glutatión. Este gen tiene una longitud total de 2.103 nucleótidos e incluye 4 intrones. La glutatión reductasa putativa codificada por esta secuencia está constituida por 486 aminoácidos, con una masa molecular estimada de 53,83 kDa. (Tabla 14).

En un análisis comparativo entre los genes *TtTrxRs*, se observan mayores diferencias entre ellos que en el caso de los genes *TtGSTs*. Así, en la Figura 68, se muestran los porcentajes de homología nucleotídica e identidad aminoacídica entre los diversos genes *TtTrxRs*. Las secuencias de los genes *TtTrxR2* y *TtTrxR5* son las más parecidas (72 % de homología nucleotídica y 73 % de similitud aminoacídica), precisamente las dos proteínas TtTrxR que carecen de selenocisteína. El porcentaje medio de homología nucleotídica es del 47 % y el de identidad aminoacídica del 55 %, en ambos casos, valores inferiores a los encontrados entre los genes *TtGSTs*. Estas diferencias en las secuencias nos permiten analizar la expresión de todos los genes *TtTrxRs* mediante PCR a tiempo real.

		IDENTIDAD AMINOACÍDICA				
HOMOLOGÍA NUCLEOTÍDICA		TtTrxR1	TtTrxR2	TtTrxR3	TtTrxR4	TtTrxR5
	TtTrxR1		68	42	50	60
	TtTrxR2	67		44	55	73
	TtTrxR3	33	32		52	47
	TtTrxR4	44	44	44		58
	TtTrxR5	53	72	32	44	

Figura 68. Matriz de homología nucleotídica (ángulo inferior) e identidad aminoacídica (ángulo superior) de TtTrxRs en *Tetrahymena thermophila*.

En las Figuras 69 y 70 se comparan las proteínas TtTrxRs y TtGR1 con las proteínas TrxRs y GRs de diversos organismos. Se comprueba de esta forma, que las proteínas TrxRs de *Tetrahymena thermophila* comparten porcentajes de similitud más elevados (> 40 %) con las tioredoxina reductasas de alto peso molecular (Figura 69), y que además estas proteínas se agrupan con las H-TrxRs en el árbol representado en la Figura 70. Respecto a la posible proteína codificada por el gen *TtGR1* a pesar de que carece de la pareja de cisteínas terminales, comparte mayores porcentajes de similitud con las H-TrxRs (entre 46 %-59 %) que con las GRs (32%-39%) (Figura 69), incluso aparece agrupada con este grupo de proteínas en el árbol de la Figura 70.

En la Figura 71 se compara la estructura tridimensional inferida a partir de las secuencias aminoacídicas de los genes *TtTrxR1*, *TtTrxR2*, *TtTrxR4* y *TtTrx5* con la proteína tioredoxina reductasa de *Homo sapiens*. En todos los casos las proteínas TtTrxR la precisión en la estimación es del 100% con un valor de fiabilidad $E=0$, salvo en el caso de la TtTrxR4 cuyo valor $E=4,8 \times 10^{-44}$. Comparando la estructura tridimensional de la proteína TtGR1 el modelo con mayor similitud es la glutatión reductasa de *Schistosoma mansoni* con un valor de fiabilidad de 0 y una precisión en la estimación del 100% (Figura 72).

	EcTrxR	PaTrxR	EhTrxR	ScTrxR	OsTrxR	AtTrxR	PfTrxR	CeTrxR	DmTrxR1	RnTrxR1	HsTrxR1	TtTrxR1	TtTrxR2	TtTrxR3	TtTrxR4	TtTrxR5	TtGR1	EcGR	SpGR	PfGR	AvGR	OsGR	AtGR	RnGR	HsGR
EcTrxR	85	65	66	69	67	66	12	14	14	14	15	13	13	13	14	12	12	17	15	13	15	15	16	14	15
PaTrxR		66	68	68	67	67	14	13	15	15	15	14	13	14	14	13	13	17	14	13	13	15	15	14	16
EhTrxR			77	74	74	74	14	13	14	14	14	14	12	14	15	12	12	15	15	14	14	16	16	14	16
ScTrxR				77	77	77	12	13	13	14	13	13	12	14	14	12	14	15	13	13	15	16	15	14	15
OsTrxR					87	87	12	12	12	14	14	12	13	13	16	12	13	14	14	14	14	15	15	14	16
AtTrxR							11	13	12	14	14	12	12	14	15	13	13	14	14	14	15	15	16	14	14
PfTrxR							49	50	49	49	51	48	43	46	47	47	51	38	36	39	35	36	36	30	36
CeTrxR								53	62	62	62	54	48	42	47	48	47	37	36	35	35	32	34	31	36
DmTrxR1									58	58	58	51	47	45	48	45	47	40	38	35	39	37	36	32	37
RnTrxR1										77	77	58	52	45	51	51	49	38	38	38	35	35	38	32	38
HsTrxR1												59	53	44	51	51	48	39	37	38	36	35	37	31	35
TtTrxR1													60	47	51	58	59	40	39	40	37	37	33	33	40
TtTrxR2														46	52	72	58	37	37	37	38	37	37	32	39
TtTrxR3															58	46	47	35	34	36	34	34	30	30	36
TtTrxR4																46	46	38	35	36	34	33	33	32	39
TtTrxR5																	56	37	36	40	39	35	35	30	38
TtGR1																	39	36	39	39	38	39	39	32	38
EcGR																		52	47	43	42	38	51	57	
SpGR																			45	41	40	39	45	53	
PfGR																				39	37	36	37	46	
AvGR																					52	47	36	42	
OsGR																						74	34	41	
AtGR																							74	33	38
RnGR																								33	79
HsGR																									

Figura 69. Matriz de identidad de proteínas TrxRs y GRs de *Tetrahymena thermophila* con otros organismos. En color verde se destacan las L-TrxRs (de bajo peso molecular), en verde las H-TrxRs (de alto peso molecular) y en azul las GRs. At: *Arabidopsis thaliana*, Av: *Anabaena variabilis*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Ec: *Escherichia coli*, Eh: *Entamoeba histolytica*, Hs: *Homo sapiens*, Os: *Oryza sativa*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Pf: *Plasmodium falciparum*, Rn: *Rattus norvegicus*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sp: *Streptococcus pneumoniae*, Tt: *Tetrahymena thermophila*.

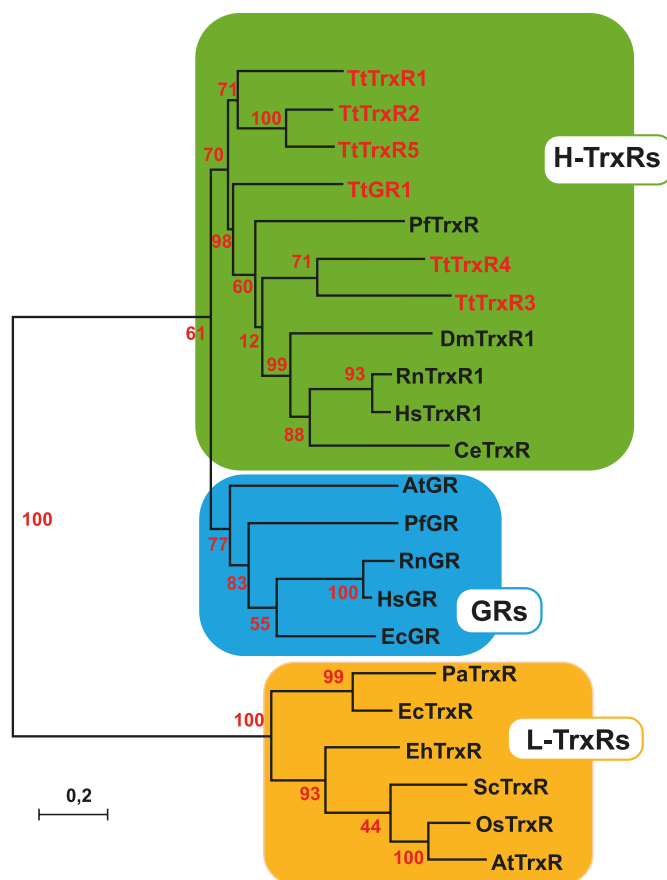


Figura 70. Árbol filogenético en el que se incluyen TtTrxRs y TtGR de *Tetrahymena thermophila* y las de otros organismo. At: *Arabidopsis thaliana*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Ec: *Escherichia coli*, Eh: *Entamoeba histolytica*, Hs: *Homo sapiens*, Os: *Ori-za sativa*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Pf: *Plasmodium falciparum*, Rn: *Rattus norvegicus*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Tt: *Tetrahymena thermophila*. En color rojo se representan los valores de muestreo aleatorio. La barra indica el número de sustituciones por sitio.

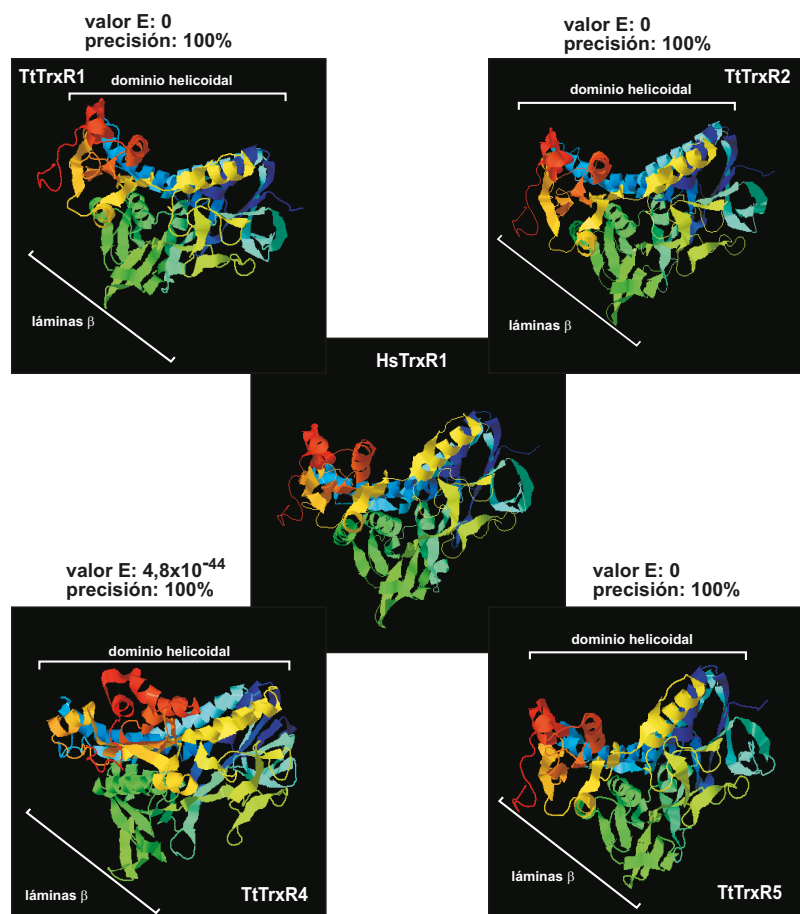


Figura 71. Estructura tridimensional inferida a partir de las secuencias aminoacídicas de algunas proteínas TtTrxRs. En la parte superior de cada imagen se especifican la eficacia (valor E) y la precisión (%) de estimación. En el centro de la figura se muestra la estructura de la HsTrxR1 con la cual se han comparado las TtTrxRs.

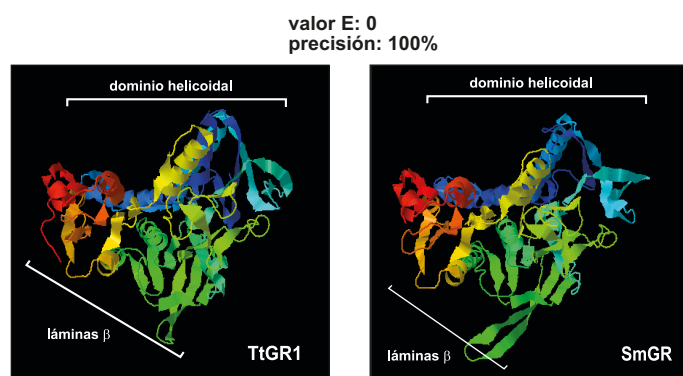


Figura 72. Estructura tridimensional inferida de la proteína TtGR1. En la parte superior de las imágenes se especifica la eficacia (valor E) y la precisión (%) de estimación. Se muestra al lado la estructura de la GR de *Schistosoma mansoni*, con la cual se ha comparado.

5.2 Análisis de la expresión de genes *TtTrxRs* y *TtGR1* por RT-PCR cuantitativa.

Los genes *TtTrxR1* y *TtTrxR2* presentan patrones de inducción a metales pesados bastante similares (Figura 73A y 73B, Tabla 11A(III) del Anexo III). Son inducidos significativamente por Cd^{2+} , As^{5+} y Pb^{2+} fundamentalmente, aunque el *TtTrxR2* también lo es por Cu^{2+} (unas 5 veces tras 24 h), y, en general, los niveles de inducción son mayores para este segundo gen. El compuesto CDNB induce a ambos, mientras que la MD sólo induce, a bajos niveles, el gen *TtTrxR1* (Tabla 11A(III) del Anexo III). Curiosamente, el Cu^{2+} reprime los niveles basales del gen *TtTrxR1* a cualquier tiempo de tratamiento (Figura 73A). El resto de los agentes estresantes no parecen que induzcan o afecten significativamente la expresión de estos dos genes.

Los genes *TtTrxR3* y *TtTrxR4*, no sólo presentan niveles bastante más bajos de inducción, sino que los patrones de inducción son bastante diferentes a los dos primeros genes *TtTrxRs* (Figuras 73C y 74A, Tabla 12A(III) del Anexo III). Ambos genes sólo son inducibles (tras exposición prolongada, 24 h) por Cd^{2+} y As^{5+} , aunque el *TtTrxR4* no lo es significativamente por Cd^{2+} (Tabla 12A(III) del Anexo III). El *TtTrxR3* es inducido, igualmente, por PQ y CDNB (unas 5 y 9 veces, respectivamente), mientras que el *TtTrxR4* sólo lo es por MD (unas 4 veces) (Tabla 12A(III) del Anexo III). El resto de los agentes estresantes no parecen que induzcan o alteren significativamente la expresión de ambos genes.

La ORF (2.387 aa) del último posible gen del tipo TrxR, como ya se indicó en el apartado previo, presenta una región de 486 aa que es la que se ha denominado *TtTrxR5* (Figuras 28A(II) del anexo-I y Figura 67). En el análisis por RT-PCR cuantitativa se ha considerado tanto la expresión de la ORF denominada como gen *TtTrxR5*, como la otra posible ORF (sin dominio TrxR) localizada en el extremo 3' de la secuencia completa (9.171 bases, Tabla 14). Los resultados se muestran en la Figura 75B y C. El gen *TtTrxR5* se induce significativamente (tanto a 2 h como a 24 h) por exposición a Cd^{2+} y As^{5+} (Tabla 13A(III) del Anexo III), y a menor nivel por Cu^{2+} y Zn^{2+} (tras 2 h de exposición) (Figura 74B, Tabla 13A(III) del Anexo III). Igualmente, es inducible por

Resultados

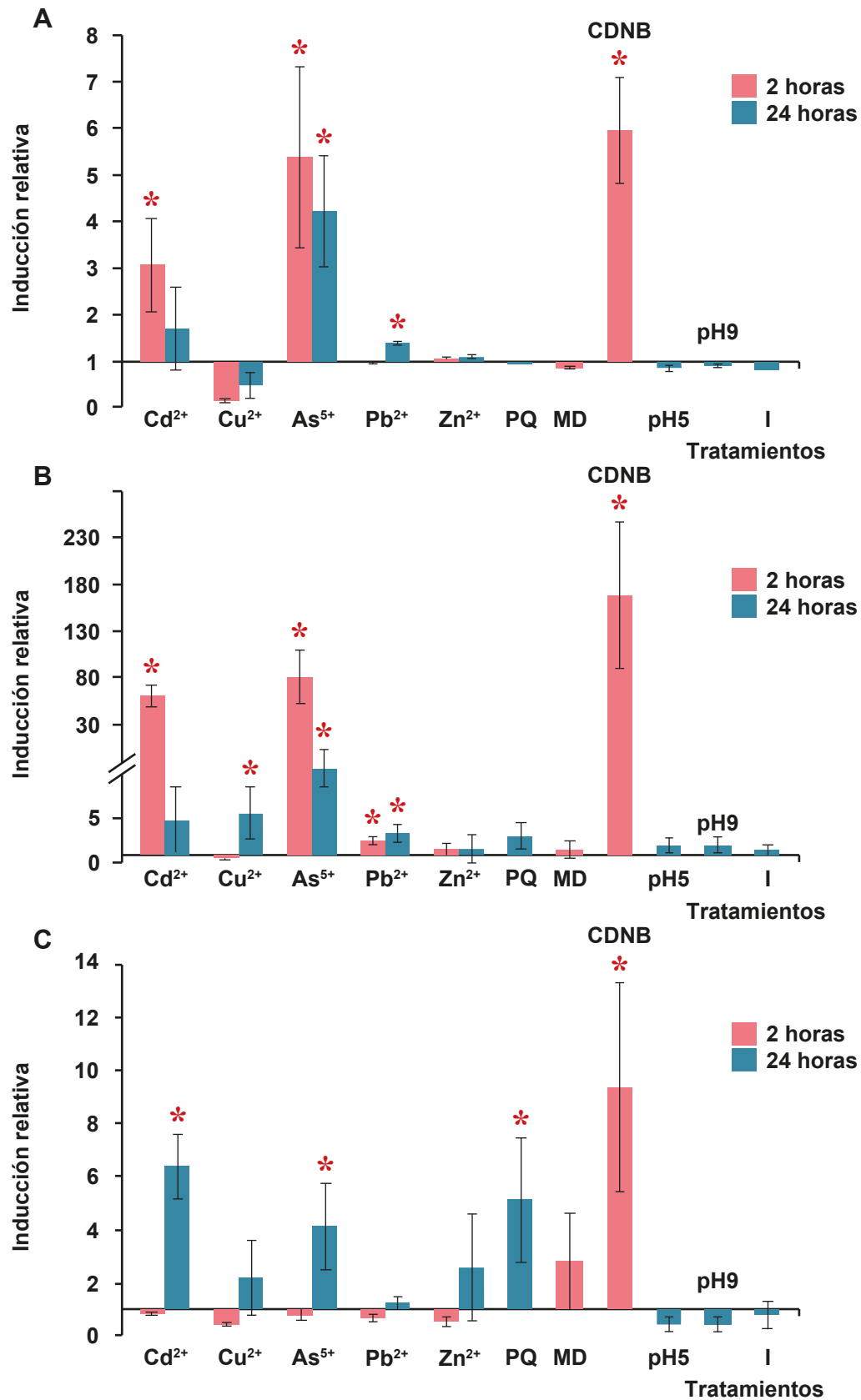


Figura 73. Niveles de inducción relativa de la expresión de los genes *TtTrxRs*. A: *TtTrxR1*, B: *TtTrxR2*, C: *TtTrxR3*. Tratamientos: Cd²⁺: 44 µM, Cu²⁺: 400 µM, As⁵⁺: 100 µM, Pb²⁺: 950 µM, Zn²⁺: 3.500 µM, PQ: paraquat (7.800 µM), MD: menadiona (5.000 µM), CDBN: 2-cloro-dinitrobenzenceno (200 µM), I: inanición (falta de nutrientes). Los asteriscos señalan los tratamientos que producen efectos significativos sobre la expresión del gen. Datos reflejados en las Tablas 11 A(III) y 12 A(III) del Anexo III..

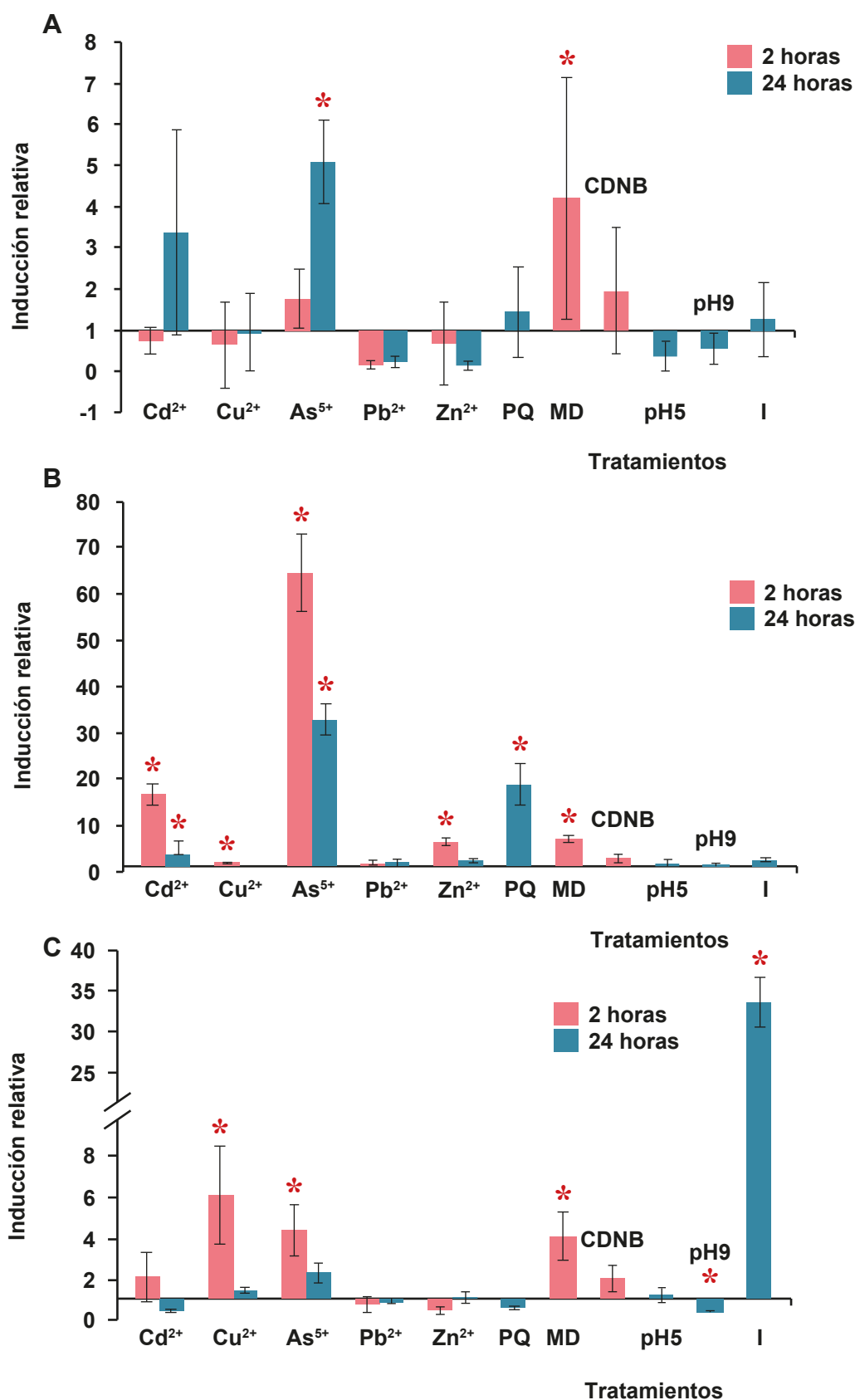


Figura 74. Niveles de inducción relativa de la expresión de los genes *TtTrxRs*. A: *TtTrxR4*, B: *TtTrxR5* (dominio TrxR), C: *TtTHERM_00723630* (fuera del dominio TrxR). Tratamientos: Cd²⁺: 44 μ M, Cu²⁺: 400 μ M, As⁵⁺: 100 μ M, Pb²⁺: 950 μ M, Zn²⁺: 3.500 μ M, PQ: paraquat (7.800 μ M), MD: menadiona (5.000 μ M), CDBN: 2-cloro-dinitrobenzeno (200 μ M), I: inanición (falta de nutrientes). Los asteriscos señalan los tratamientos que producen efectos significativos sobre la expresión del gen. Datos reflejados en las Tablas 12 A(III) y 13 A(III) del Anexo III..

Resultados

PQ y MD, pero no significativamente por CDNB (Tabla 13A(III) del Anexo III). Por el contrario el gen (sin dominio TrxR) presenta un patrón de inducción muy diferente del anterior, indicando que se trata de otro gen diferente (Figura 74C, Tabla 13A(III) del Anexo III). Es significativamente inducible por Cu^{2+} y As^{5+} (2 h), MD (2 h) y fuertemente inducible por inanición (unas 32 veces) (Tabla 13A(III) del Anexo III), lo cual se diferencia del resto de los patrones de inducción de los genes considerados aquí como codificantes de TrxRs, los cuales no se inducen por inanición (Tabla 12A(III) del Anexo III).

Por lo tanto, según los resultados de RT-PCR cuantitativa, a la región denominada como THERM_00723630 (y considerada originalmente como un único gen) en el genoma de *T. thermophila* (www.ciliate.org), no puede ser considerada como un solo gen, sino más bien una región que puede contener más de un gen (al menos dos que se expresan con un diferente patrón, bajo las mismas condiciones experimentales). Uno de ellos (el denominado *TtTrxR5*) puede considerarse como una ORF codificando una TrxR.

Por último, el único gen homólogo a GR encontrado en el genoma de *T. thermophila* (el denominado *TtGR1*), se induce significativamente por Cd^{2+} (24 h), pero fundamentalmente por As^{5+} y Pb^{2+} (Figura 75, Tabla 14A(III) del Anexo III). Igualmente, es fuertemente inducible por el compuesto CDNB (Tabla 14A(III) del Anexo III) y el pH básico disminuye sus valores basales de expresión.

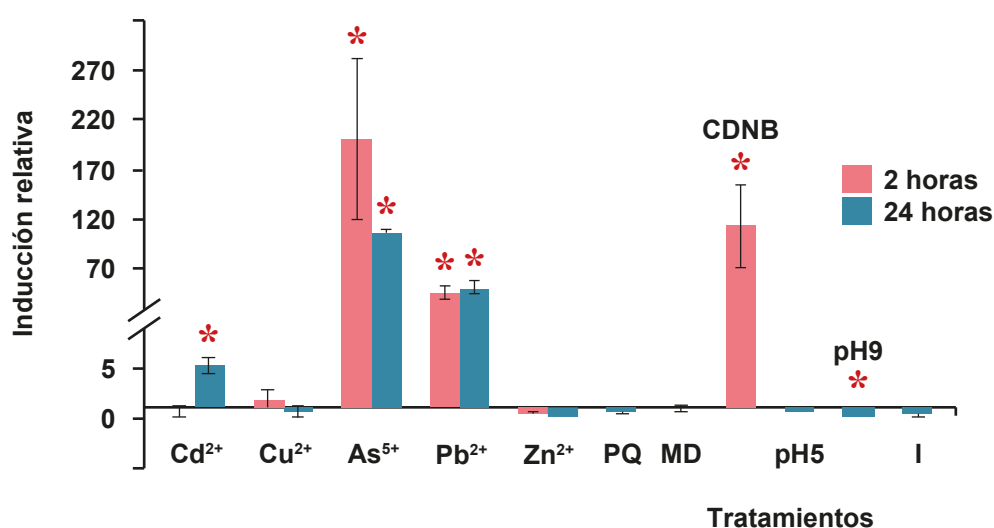


Figura 75. Niveles de inducción relativa de la expresión del gen *TtGR1*. Tratamientos: Cd^{2+} : 44 μM , Cu^{2+} : 400 μM , As^{5+} : 100 μM , Pb^{2+} : 950 μM , Zn^{2+} : 3.500 μM , PQ: paraquat (7.800 μM), MD: menadiona (5.000 μM), CDNB: 2-cloro-dinitrobenzono (200 μM), I: inanición (falta de nutrientes). Los asteriscos señalan los tratamientos que producen efectos significativos sobre la expresión del gen. Datos reflejados en la Tabla 14 A(III) del Anexo III..

6 TRIPANOTIÓN SINTETASAS (TrySs)- GLUTATIONILESPERMIDINA SINTETASAS (GspSs) EN *T. thermophila*.

6.1 Análisis *in silico*.

Tras explorar el genoma macronuclear de *T. thermophila*, hemos identificado 4 potenciales ORFs, que podrían codificar proteínas con dominios descritos como tripanotión sintetasas (TryS) o glutationilespéridimidina sintetasas (GspS). Algunas características de estos genes, que hemos denominado *TtGspS1*, *TtGspS2*, *TtGspS3* y *TtGspS4*, (por su mayor similitud con GspS) se muestran en la Tabla 15. Sólo dos de ellos presentan intrones (*TtGspS1* y *TtGspS4*), que son, curiosamente, los que producen la proteína más pequeña (111 aa) y la más grande (1.547 aa), respectivamente (Tabla 15). Dos de ellos están localizados en el brazo izquierdo del cromosoma 4 y un tercero en el cromosoma 5 (Tabla 15). Del análisis *in silico* se infiere que todas las posibles GspSs encontradas en el ciliado *T. thermophila* carecen del dominio amidasa y presentan tan sólo el dominio sintetasa (Figura 76). En el gen *TtGspS1* el dominio sintetasa está truncado (con un valor $E = 5,5 \times 10^{-11}$), sólo posee 382 nt de longitud total y en él se puede localizar un intrón (Tabla 15, Figura 76). Los genes *TtGspS2* y *TtGspS3* carecen de intrones y tienen una longitud total de 1.812 y 1.686 nt, respectivamente (Tabla 15), ambos tienen un dominio GspS (con valores $E = 1,8 \times 10^{-56}$ y $1,5 \times 10^{-59}$, respectivamente). A diferencia de los genes anteriores, el gen *TtGspS4* presenta una longitud total muy superior, con 6.264 nt (Tabla 15), y tres intrones. La proteína que codifica (1.547 aa) posee tres dominios; un dominio inter-alfa-tripsina ($E = 3,1 \times 10^{-38}$) localizado en el extremo N-terminal de un segundo dominio von Willebrand tipo-A (lugar de adhesión dependiente de metal-cación divalente- o MIDAS) ($E = 1,3 \times 10^{-16}$) y un tercer dominio GspS ($E = 7,3 \times 10^{-61}$) (Figura 76). Tras realizar un análisis de identidad con las correspondientes secuencias aminoacídicas de estos 4 genes, detectamos que;

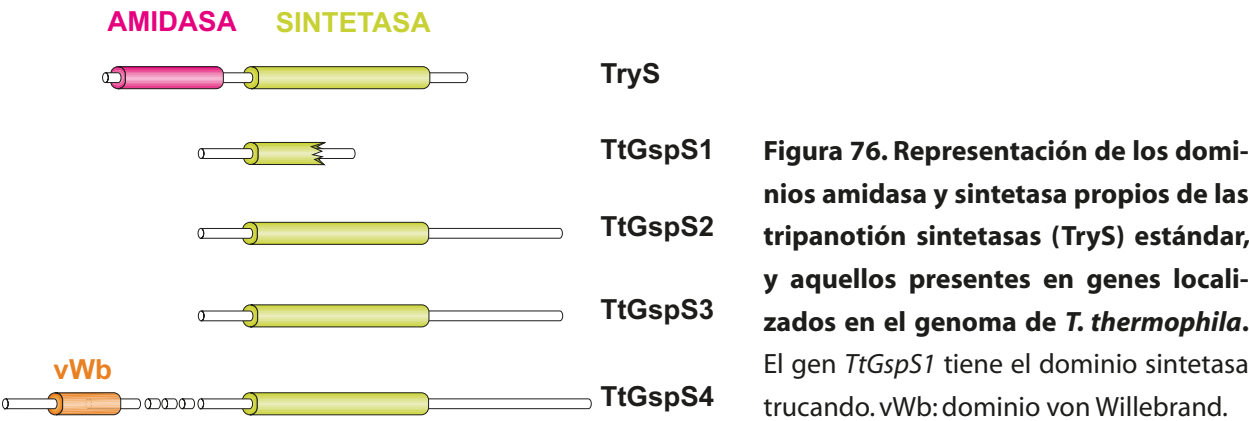
- 1) la *TtGspS1* presenta un % de identidad del 57% ($E = 2 \times 10^{-26}$) con la *TtGspS2* y un 53% ($E = 2 \times 10^{-23}$) y 51% ($E = 2 \times 10^{-22}$) con *TtGspS3* y *TtGspS4*, respectivamente. Igualmente, tiene un 37% de identidad ($E = 3 \times 10^{-6}$) con la tripanotion sintetasa del protozoo parásito *Crithidia fasciculata* (CfTryS).
- 2) la *TtGspS2* tiene un 54% de identidad ($E = 0,0$) con *TtGspS3* y un 58% ($E = 0,0$) con *TtGspS4*. Además, tiene un 27% con GspS de proteobacterias, tales como; *Ralstonia eutropha* ($E = 6 \times 10^{-39}$) o *E. coli* ($E = 3 \times 10^{-29}$).
- 3) la *TtGspS3* presenta un 86% ($E = 0,0$) de identidad con *TtGspS4* y un 28 ó 27% con las GspS de bacterias *R. eutropha* ($E = 2 \times 10^{-39}$) y *Haemophilus influenzae* ($E = 2 \times 10^{-32}$).
- 4) la *TtGspS4* presenta un 79% de identidad con otra proteína de *T. thermophila* (que contiene un dominio von Willebrand tipo-A) ($E = 0,0$), un 86% ($E = 0,0$) con la *TtGspS3*,

Resultados

un 58% ($E=0,0$) con la TtGspS2 y un 30% ($E=0,0$) con la GspS bacteriana de *R. eutropha* (ReGspS) ($E=8e-41$).

Gen	Denominación ¹	Longitud (pb)	Intrones	Proteína (aa)	Masa molecular	CR	Región cromosómica
TtGspS1	TTHERM_00932050	382	1	111	12,95	Nd	scf_8254503
TtGspS2	TTHERM_00069610	1.812	0	603	70,05	5	scf_8254811
TtGspS3	TTHERM_00402200	1.686	0	561	65,62	4L	scf_8254666
TtGspS4	TTHERM_00404210	6.264	3	1.547	179,01	4L	scf_8254666

Tabla 15. Algunas características de los genes codificantes de posibles proteínas similares a GspS presentes en *T. thermophila*. CR: cromosoma. 4L: brazo izquierdo del cromosoma 4, 5: cromosoma 5, Nd: sin determinar.¹: Denominación según la web del genoma macronuclear de *T. thermophila* (www.ciliate.org).



Realizamos un alineamiento múltiple (método T-Coffee) de las posibles proteínas GspSs de *T. thermophila* con proteínas TrySs de tripanosomátidos y GspSs de tripanosomátidos y bacterias. En la Figura 77 se muestra el árbol filogenético inferido de este alineamiento, en el cual las GspS/TryS de ciliados se agrupan separadamente de las GspS/TryS de tripanosomátidos, aunque hay un punto de conexión más cercano con las GspS de estos protozoos parásitos. Conectada con las bacterianas hay una GspS obtenida del insecto *Bombus impatiens*.

Un análisis de la estructura 3D inferida de las secuencias aminoacídicas ha mostrado que la proteína TtGspS2 presenta una estructura (Figura 78A) similar, en primer lugar, a la enzima GspS bifuncional (amidasa + sintetasa) de *E. coli* (con una confianza del 100% ($E=0,0$) y un % de identidad, al compararla con la estructura-plantilla, de un 25%, y en segundo lugar con la Lm-TryS (TryS bifuncional (amidasa + sintetasa) del protozoo parásito *Leishmania major*) (con 100% de confianza y 23% de identidad). Igualmente, la proteína TtGspS3 tiene una estructura 3D (Figura 78B) con resultados similares a los de TtGspS2. Al ser la TtGspS1 similar a la TtGspS2 y la TtGspS4 similar a la TtGspS3 (86% de identidad), inferimos que las estructuras 3D de sus domi-

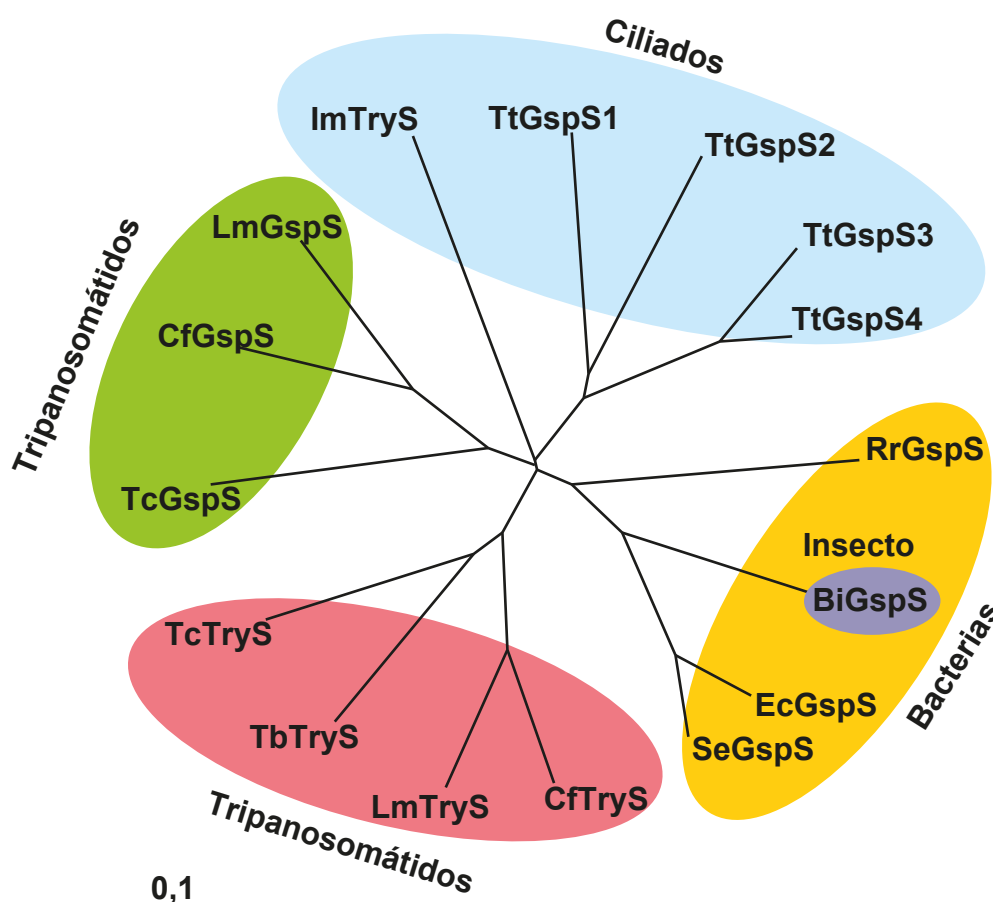


Figura 77. Árbol filogenético obtenido del alineamiento de secuencias aminoacídicas correspondientes a GspS y TryS de diferentes organismos (incluyendo las cuatro GspS de *T. thermophila*, TtGspS1/2/3/4). LmGspS/LmTryS: *Leishmania major*, CfGspS/CfTryS: *Crithidia fasciculata*, TcGspS/TcTryS: *Trypanosoma crucii*, TbTryS: *Trypanosoma brucei*, ImTryS: *Ichthyophthirius multifiliis*, BiGspS: *Bombus impatiens*, RrGspS: *Rhodospirillum rubrum*, EcGspS: *Escherichia coli*, SeGspS: *Salmonella enterica*. La barra indica el número de sustituciones/sitio.

nios GspS serán semejantes a las dos previamente analizadas. Sin embargo, cuando se realiza el análisis de modelado 3D de la TtGspS1 (que tiene un dominio sintetasa truncado) se alinean 98 residuos (el 88% de la secuencia) con la estructura-plantilla, obteniéndose en primer lugar de la lista similitud (100% de confianza y 32% de identidad) con la estructura 3D de la bifuncional LmTryS, y en segundo lugar (100% de confianza y 34% de identidad) con la GspS bifuncional de *E. coli*. Y, por último, con respecto a la TtGspS4, el dominio GspS presenta una estructura 3D similar a la GspS bifuncional de *E. coli* (como en los casos anteriores) (100% de confianza y 26% de identidad) (Figura 78C), mientras que el dominio von Willebrand de la TtGspS4 se identifica con la estructura 3D de una proteína humana (*Homo sapiens*) complemento factor B que presenta un dominio von Willebrand (99,8% de confianza y 20% de identidad).

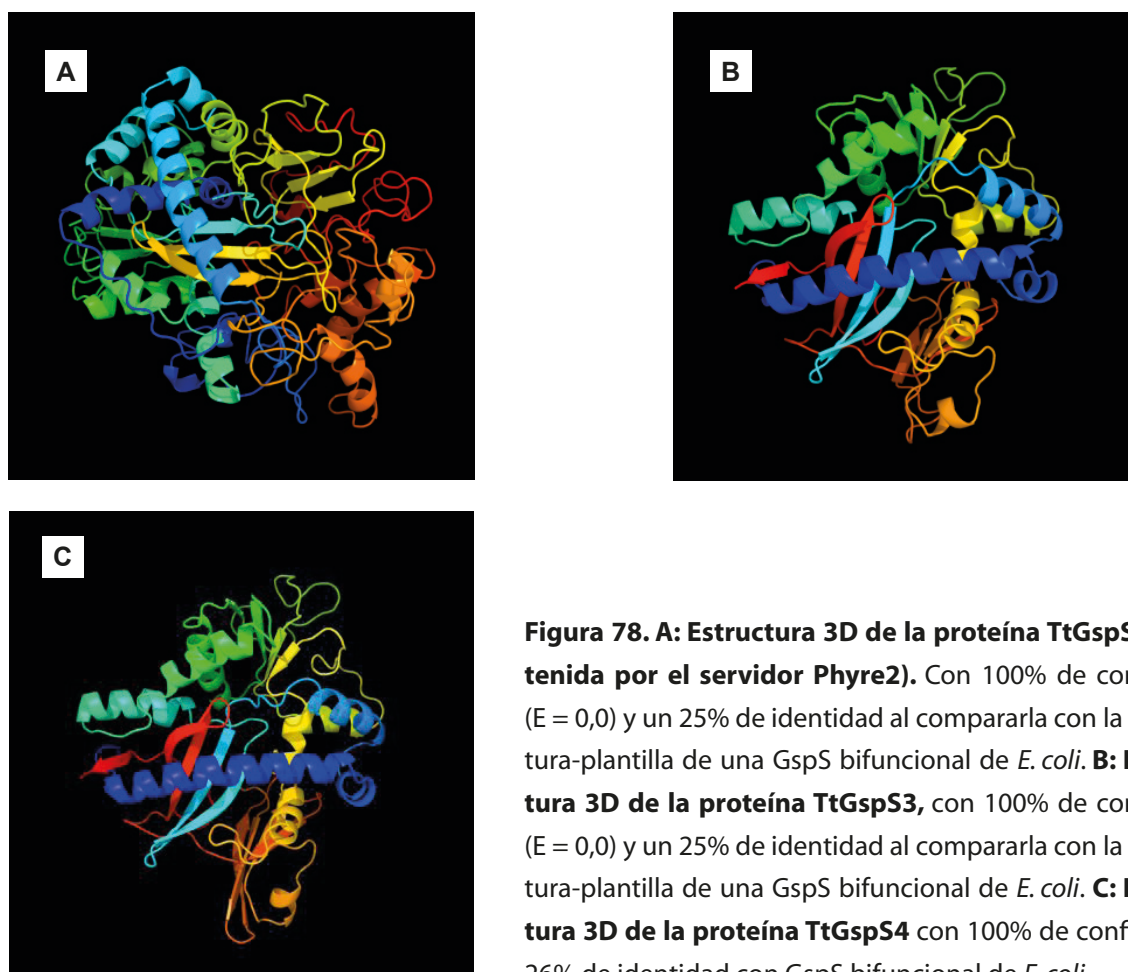


Figura 78. A: Estructura 3D de la proteína TtGspS2 (obtenida por el servidor Phyre2). Con 100% de confianza ($E = 0,0$) y un 25% de identidad al compararla con la estructura-plantilla de una GspS bifuncional de *E. coli*. **B: Estructura 3D de la proteína TtGspS3,** con 100% de confianza ($E = 0,0$) y un 25% de identidad al compararla con la estructura-plantilla de una GspS bifuncional de *E. coli*. **C: Estructura 3D de la proteína TtGspS4** con 100% de confianza y 26% de identidad con GspS bifuncional de *E. coli*.

6.2. Análisis de la expresión de algunos genes *TtGspS*.

De los cuatro posibles genes *TtGspSs*, el *TtGspS1* se ha descartado para el estudio de su expresión ya que su dominio sintetasa está truncado (Figura 76), y probablemente no sea funcional. Además, también existe un problema para poder diferenciar entre los genes *TtGspS3* y *TtGspS4*, ya que como se muestra en la Figura 79, la homología entre la secuencia completa del *TtGspS3* y la mayoría de la secuencia del gen *TtGspS4* es muy elevada (93%). Por esta razón se descartó el análisis del gen *TtGspS3*, y para poder analizar el gen *TtGspS4*, se diseñaron cebadores de la región que corresponde al dominio de von Willebrand (exclusivo de este gen) (Figura 76). Los resultados del estudio de la expresión de los genes *TtGspS2* y *TtGspS4* se muestran en la Tabla 15 A (III) (Anexo III) y la Figura 80. Igualmente, en las Figuras 30A(I) y 31A(I) del Anexo I se muestran las secuencias de ambos genes y la localización de los cebadores diseñados para la RT-PCR cuantitativa.

TtGspS3	ATGTTATTAAATATAAAATACCTATTGCAGCAGTTGGATTAGTAGCCCTTGACTTTATTTTCCCATAAATAAAAAAGA	81
TtGspS4	AAGTTATTAAATATAATATGTCAGCAGCAGCAGCTGGATTACTAGCGTTTGACTTTATTTACCATAAATAGGAAAAAGA	4575
TtGspS3	TTTATTAATTCCTTGTAGGACACAAATGTTGATGTTCAAAGAAGAGCTAATTTTCAACCATTAAAAGATTGGAATGTAAA	162
TtGspS4	AGTAATAATAATTCGGAGGACAAAAATGTTGATGTTTAAAGAAGAGCTAATTTTCAACCATTAAAAGATTAGAAATGTAAA	4656
TtGspS3	TTTAGAGAGATATTTTTGATTTTATAATCTCTAAGGCACCTAGATGGAATGGATATTTTTTGGTTATTCAAATGATAAT	243
TtGspS4	TTTAGAGAGATATTTTTGATTTTATAAAATCGAAGGTACTAGATGGAAGGACTTTTTTTGGCTACTCAAATGATAAT	4737
TtGspS3	TATTGGATAGATGGTGTCTGGTTATTAATTATCTGAGAACTATTTACAAATCTGATCAAACTACACATGAACCTCATAAT	324
TtGspS4	TATTGGATAGATGGTGTCTGGATATTAATTATCTGAGAACTATTTACAAATCTAATCAAACTACACATGAACCTCATAAT	4818
TtGspS3	ATGTGCTTAGAAGCTACAGATATAGCATTAAATGATGATCTATTATTTAAAGAGGTCTTTGATATTCTTAAAGATATGTTT	405
TtGspS4	ATGTGCTTAGAAGCTACAGATAGAGTATTAAAGATGATCTATTATTTAAAGAGGTCTTTGATATTCTTAAAGATATGTTT	4899
TtGspS3	CCTATAATTCGAAAATCATGGGAAAATAGATACTAGATTGCTATCTCGCTATGATTTTATTTAGGGAAAATGGATAA	486
TtGspS4	CCTATAATTCGAAAATCATGGGAAAATAGATACTAGATTGCTATCTCGCTATGACTTTTATTTAGGGAAAATGGGTAA	4980
TtGspS3	TTTACTTTTTAGAAAGTAAATGGTGATACTCCCTCTTGTATCATTGAAGCAGGACAAGCTTAAAGCTATGGGCTGAATAG	567
TtGspS4	TTTACTTTTTAGAAAGTAAATGGTGATACTCCCTCTTGTATCATTGAAGCAGGACAAGCTTAAAGCTATGGGCTGAATAG	5061
TtGspS3	TTCTAACTCTTTAGTTTAATAATATAGATTTTGAGATAAAATAAGGTCTGTAAAGATTATGGAGTAGAATGGAAAATCA	648
TtGspS4	TTCTAACTCTTTAGTTTAATAATATAGATTTTGAGATCAAAATAAGGTCTGTAAAGATTATGGAGTAGAATGGAAAATCA	5142
TtGspS3	AAGCTTTTTATGCTTAATAATTCAACTGGGAAGATAAGTGACTTTTAATTATTTACATTCTCTAATTAAGCCATTCTTG	729
TtGspS4	AAGCTTTTTATGCTTTATAATTCAGCTAGGAAGATAAGTGACTTTTAATTATTTACATTCTCTAATTAAGCTATATCA	5223
TtGspS3	GCAAATATTTCAATTGACACAAAAACATTTCTAAAATAGAGAATGTTATTGAAAATGAATTAATAACAGATAACTTTAAA	810
TtGspS4	ACAAATATTTCAATTGACATAAAAACATTTCTAAAATAGACGATGTTATTGAAAATGAATTAATAACAGATAACTTTAAA	5304
TtGspS3	TCAAGTATTATTTGAAGCAATACCCTTTGGAGTGGTTAGCATCTGAGTCTACTTATAATTTTTTACAAATCCTTAATTT	891
TtGspS4	TCAAGTATTATTTGAAGCAATACCCTTTGGAGTGGTTAGCATCTGAGTCTACTTATAATTTTTTACAAATCCTTAATTT	5385
TtGspS3	TATGATAATAAATCATAAATAATGATTGAACACCTTGGAAAATTATTATGTCTAATAAAGCTATGAGTGTGCTTTTGTAT	972
TtGspS4	TATGATAATAAATCATAAATAATGATTGAACACCTTGGAAAATTATTATGTCTAATAAAGCTATGAGTGTGCTTTTGTAT	5466
TtGspS3	AACATGTTTCCCTAAAACCTCATTAGCAAAAGCTAGTCTTGAACCTATAAGATACGGAGGTAGCGGTATTCCTTAAGTA	1053
TtGspS4	AACATGTTTCCCTAAAACCTCATTAGCAAAAGCTAGTCTAGGACCTATAAGATACGGAGGTAGCGGTATTCCTTAAGTA	5547
TtGspS3	TCTAAGTAAAAATATGGAAGGGAAGGAGATTCTATAATCTTTTCCAAATATTATAA---TGATTTTGAATTATTCTAACT	1131
TtGspS4	TCTAAGTAAAAATATGGAAGGGAAGGAGATTCTATAATCTTTTCTAATTATTATAAAGGTGATTTTGAATCTTTCTAACT	5628
TtGspS3	GATTCCTTACAAGAAATTTCTTCAAAACCCATATTTTAAAGAGTTTATCGATTCTGATCATCACTAACAAAGATACATTACG	1212
TtGspS4	GATTCCTTACTAGAAATTTCTTCAAAACCCATATTTTAAAGAGTTTATCGATTCTGATCATCACTAACAAAGATACATTACG	5709
TtGspS3	CTAAGCTGTTGGGTAATTTAAGGTAAACCTTGCGGTATAGTAATAAGAGAAGACCTGAATCCAATTATTGGATAAGGAAGC	1293
TtGspS4	CTAAGCTGTTGGGTAATTTAAGGTAAACCTTGCGGTATAGTAATAAGAGAAGACCTGAATCCAATTATTGGATAAGGAAGC	5790
TtGspS3	TCAGTTGTTCCCTTATTATATTGAAAAAAATAATCAGAAAATGAATAGTAAATATAAATAGATTTAATTACTGATACTACT	1374
TtGspS4	TCTGTTGTTCCCTTATTATATTGAAAAAAATAATCAGAAAATGAATAGTAAATATAAATAGATTTAATTACTGATACTACT	5871
TtGspS3	CAGTCTAATATTAGGTAATCACTTTATGGAAGAAGAATTTAATTCAAATACTGACTTGATTAGATTACAAGAGAACATA	1455
TtGspS4	CAGTCTAATATTAGGTAATCACTTTATGGAAGAAGAATTTAATTCAAATACTGACTTGATTAGATTACAAGAGAACATA	5952
TtGspS3	GCTGAAAAAACTTAGTATATTGACCCGTTATTTCAGATAATCTAATCAGATAAAACATTTAATCTATCAAATGTAGGAA	1536
TtGspS4	ACTGAAAAAAGTAGTATGTTGACCCGTTATTTCAAATAAATAATCAGATAAAACATTTAATCTCAGTTATTTATAGAAA	6033
TtGspS3	AAAACATGAGGCACCTTTCAGGATATCATGACTACTAATATTAACTTAAACTCATGGCCTACTATGTTTTAATAATCT	1617
TtGspS4	AAAACGTGATGAGCTCTACATAAAATAATTAGATGCAACCTAATCTTTTACTGATAGGCTTTTAGATGCAATAATAGCCT	6114
TtGspS3	TAATAAAATAAGACTACTCATAGATAATCTGCGGATCTACAGGAAAGAGATTAGTCTTCTTCTTGA	1686
TtGspS4	AATTAATAAATAAGACTACTCATAGATAATCTGCGGATCTACAGGAAAGAGTTTAGTCTTCTTCTTGA	6183

Figura 79. Alineamiento entre la secuencia completa del gen *TtGspS3* y la incompleta del gen *TtGspS4*.
Los nucleótidos sombreados en amarillo indican la similitud absoluta entre ambas secuencias.

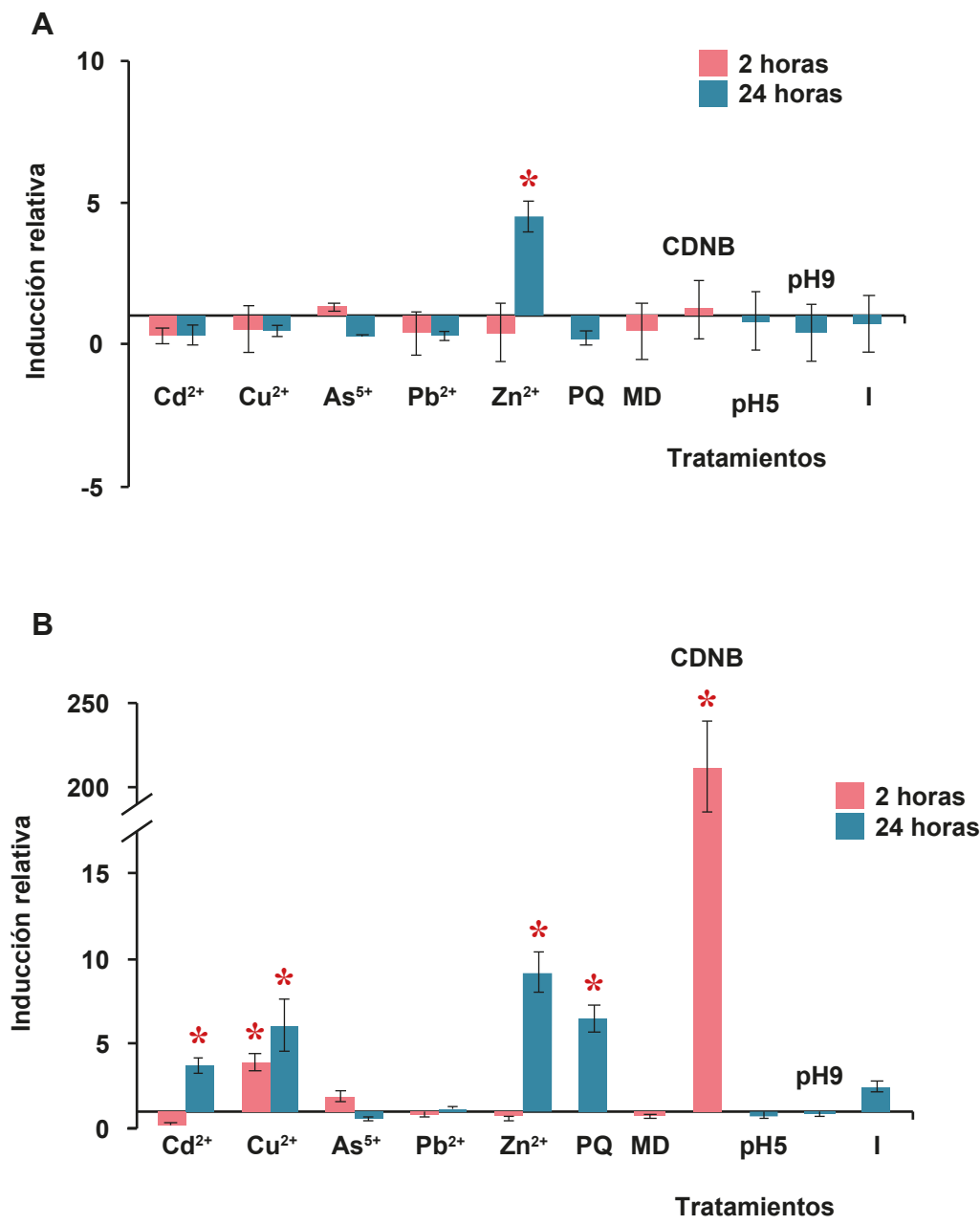


Figura 80. Niveles de inducción relativa de la expresión de genes codificantes para TtTrySs mediante RT-PCR cuantitativa. A: *TtGspS2*, B: *TtGspS4*. Tratamientos: Cd²⁺: 44 μ M, Cu²⁺: 400 μ M, As⁵⁺: 100 μ M, Pb²⁺: 950 μ M, Zn²⁺: 3.500 μ M, PQ: paraquat (7.800 μ M), MD: menadiona (5.000 μ M), CDNB: 2-cloro-dinitrobencono (200 μ M), I: inanición (falta de nutrientes). Los asteriscos señalan los tratamientos que producen efectos significativos ($p < 0,05$) sobre la expresión del gen respecto a los niveles basales (véanse Tabla 15A(III) del Anexo III).

El gen *TtGspS2* se mantiene reprimido en la casi totalidad de las condiciones o tratamientos estrés utilizados, a excepción del Zn^{2+} (24h) bajo el cual muestra cierto nivel de expresión significativa (unas 4 veces respecto del control) (Tabla 15 A(III), Anexo III, Figura 80A). En cambio, el gen *TtGspS4* es inducido significativamente por algunos metales pesados; el Cu^{2+} (a exposición corta o prolongada) y el Cd^{2+} y Zn^{2+} (a 24h) (Tabla 15 A(III), Anexo III, Figura 80B). Igualmente, este gen es inducible por PQ y principalmente por CDNB (unas 200 veces) (Tabla 15 A(III), Anexo III, Figura 80B). Otros agentes estresantes analizados, no causan variaciones significativas en la expresión de estos genes (Tabla 15 A(III), Anexo III, Figura 80B).

7 PRESENCIA DE TRIPANOTIÓN (T[SH]_2) EN *Tetrahymena thermophila*.

7.1 Biosíntesis de (T[SH]_2) en extractos celulares

Una vez que se comprobó la expresión de al menos dos (*TtGspS2* y *TtGspS4*) de los posibles genes codificantes para posibles GspS/TryS de *T. thermophila*, quisimos ver si algunos de ellos podría codificar una enzima GspS/TryS capaz de biosintetizar tripanotión, para lo que se analizó la presencia de esta molécula en extractos celulares derivados del ciliado *T. thermophila*. A una mezcla que contenía los sustratos para una TryS estándar (GSH, espermidina, ATP y NADPH, necesarios para la síntesis de tripanotión) se añadieron extractos celulares concentrados de este ciliado, midiendo así la posible actividad enzimática total existente en células derivadas de una población en crecimiento exponencial. Tras un período de incubación, las muestras fueron marcadas con monobromobimano (mBrB) y se separaron por cromatografía de alta resolución, según se describe en el apartado 3.8 de Material y Métodos. En la Figura 81 se muestran los cromatogramas de separación por HPLC de compuestos tiólicos obtenidos para las distintas muestras, junto con aquellos utilizados como patrones. En la Tabla 16 se especifican los tiempos (min) de retención de cada pico, su naturaleza química y la cantidad estimada de cada uno de los componentes detectados en el cromatograma. El cromatograma de la Figura 81A corresponde a una muestra patrón, constituida por una mezcla de tripanotión (T[SH]_2) y alguno de sus derivados químicos; glutatión (GSH) y glutationylespermidina (Gsp), a una concentración de 100 pM. El tiempo de elución de los diferentes compuestos integrantes de la muestra se incrementa, a medida que el tamaño molecular es mayor. Así, para los tres compuestos de la mezcla patrón los tiempos de elución, en las condiciones experimentales ensayadas, fueron de 31,83 min para el GSH, 51,24 min para la glutatiónylespermidina y de 56,22 min para el tripanotión (Tabla 16). El cromatograma de la Figura 81B muestra un control negativo que contenía todos los componentes de reacción sin extracto celular, que se sustituyó por la misma

Resultados

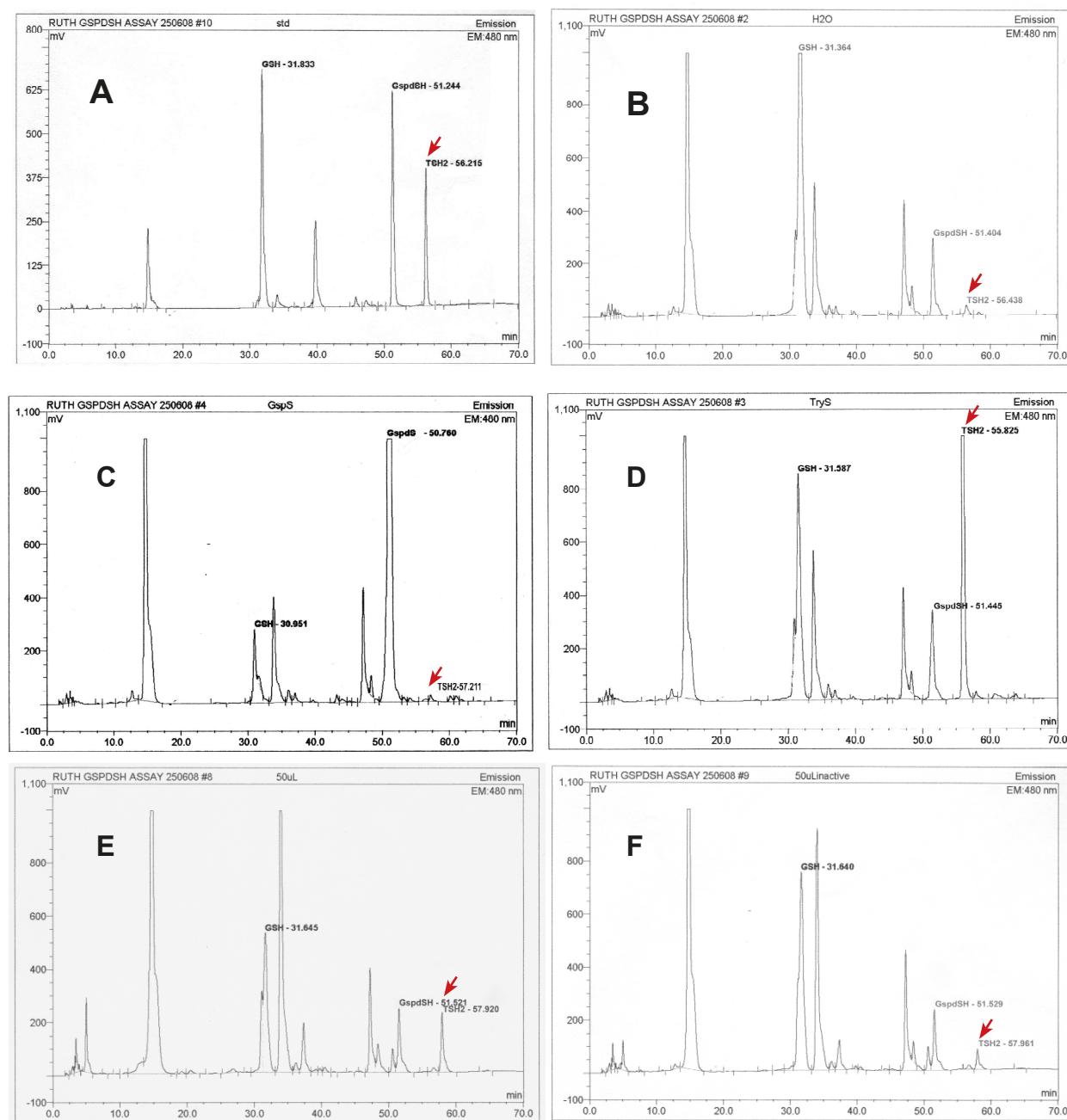


Figura 81. Cromatogramas de la separación por HPLC de grupos tiólicos obtenidos de extractos celulares de *T. thermophila* para la detección de posible actividad TryS. A: patrón de GSH, espermidina y T[SH]₂ marcados con mBrB; B: control negativo (una mezcla acuosa que contiene todos los elementos necesarios para la síntesis de T[SH]₂ a excepción de la enzima TryS); C: control con la enzima GspS de *Crithidia fasciculata*, D: control con la enzima TryS de *C. fasciculata*; E: 50 μl del extracto celular de *T. thermophila*; F: 50 μl del extracto celular de *T. thermophila* inactivado previamente por calor. Con flechas de color rojo se destacan los picos correspondientes a T[SH]₂...

Muestra	Cromatograma	Naturaleza química del pico	Tiempo de retención (min.)	Cantidad (pmol/5 μ L)
Patrón	A	GSH	31,02	100
		Gsp	51,24	100
		T[SH] ₂	56,22	100
H ₂ O	B	GSH	31,36	>100
		Gsp	51,40	64,44
		T[SH] ₂	56,46	18,66
GspS ¹	C	GSH	30,95	65,47
		Gsp	50,76	>100
		T[SH] ₂	57,21	9
TryS ¹	D	GSH	31,59	223,48
		Gsp	51,45	88,52
		T[SH] ₂	55,83	>100
Extracto activo	E	GSH	31,65	121,99
		Gsp	51,52	57,12
		T[SH] ₂	57,952	78,28
Extracto inactivo	F	GSH	31,64	217,23
		Gsp	51,53	23,88
		T[SH] ₂	57,96	29,28

Tabla 16. Características de los picos obtenidos en el análisis por HPLC de la presencia de tripanotión en extractos celulares (activo e inactivo) de *T. thermophila*. ¹: controles positivos utilizando las enzimas GspS o TryS de *C. fasciculata*.

cantidad de agua ultrapura. Hay que hacer constar que, en los cromatogramas no es posible integrar siempre el área de los picos y por tanto, cuantificar la cantidad de cada compuesto tiológico, debido a que en algunos casos, los picos aparecen cortados y el área que podemos integrar no se corresponde totalmente con área real. Los cromatogramas C y D (Figura 81, Tabla 16), corresponden a dos controles (positivos), en donde a las mezclas de reacción se añadió CfGspS o CfTryS, respectivamente. En el cromatograma C, se detecta que el producto mayoritario (no cuantificable) es Gsp, indicando así que la enzima CfGspS ha funcionado originando Gsp a partir de GSH (Tabla 16). Igualmente, en el cromatograma D (Figura 81) se detecta un pico (no cuantificable) que denota una cantidad de T[SH]₂ probablemente debida a la actividad de la CfTryS añadida a la mezcla (Tabla 16). En el cromatograma E (Figura 81), que corresponde a la muestra que contiene 50 μ L del extracto celular presumiblemente activo (sin inactivar por calor) de *T. thermophila* se resuelven tres picos distintos; el pico más temprano, corresponde a GSH, con un tiempo de elución 31,65 min (Tabla 16), el segundo pico aparece al cabo de 51,52 minutos y corresponde a glutationilperimidina (Gsp) (Tabla 16), y el tercer pico se ha identificado como correspondiente a tripanotión (T[SH]₂), resolviéndose a los 57,92 min (Tabla 16). Se realizó un segundo control negativo (cromatograma F de la Figura 81), inactivando el extracto celular por calor, antes de incubarlo con la mezcla de sustratos, en donde los picos asignables a Gsp y T[SH]₂ disminuyeron sus valores (Tabla 16) respecto de aquellos obtenidos en el extracto celular presumiblemente activo (cromatograma E de la Figura 81, Tabla 16).

7.2. Biosíntesis de T[SH]₂ in vivo.

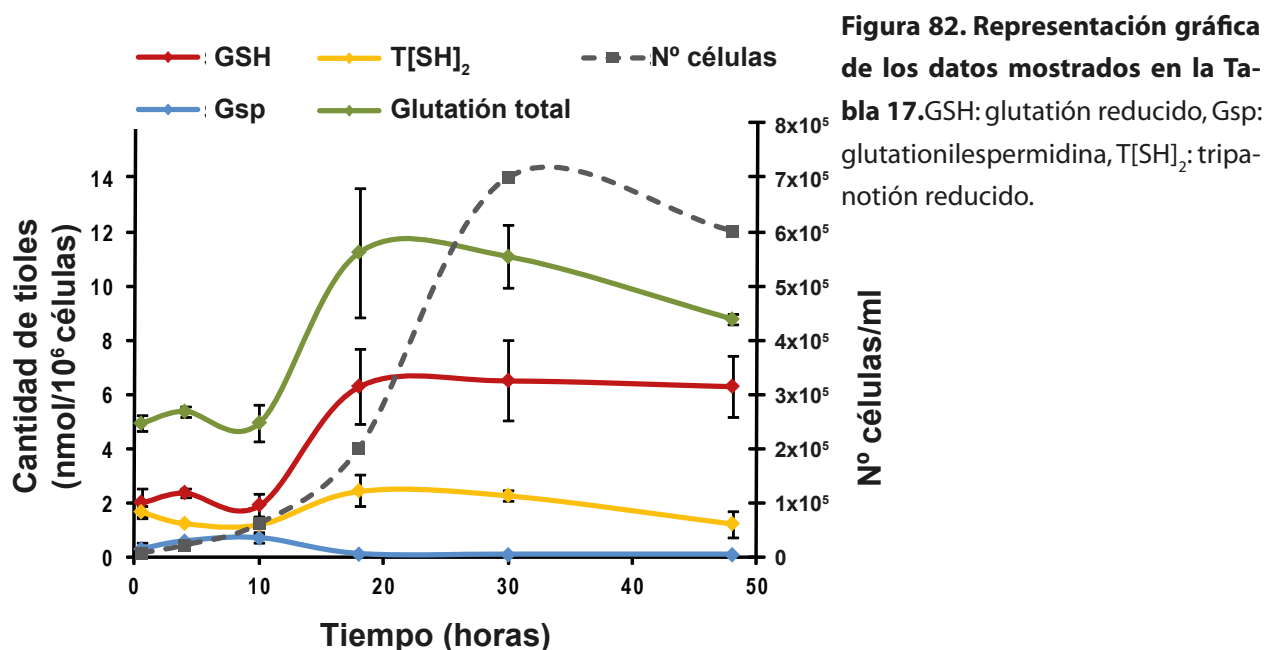
7.2.1 Biosíntesis de T[SH]₂ durante el crecimiento.

Como se ha podido comprobar (Figura 39) a lo largo de la curva de crecimiento celular de *T. thermophila* se producen variaciones en los niveles de glutatión. Por los experimentos mostrados previamente, conocemos que en *T. thermophila* existe un segundo antioxidante (tripanotión), por lo que se quiso analizar igualmente este compuesto junto con el GSH y la glutatiónilperimidina (Gsp) durante la curva de crecimiento de este microorganismo. Las cantidades de cada compuesto tiólico se determinó mediante HPLC (apartado 3.9.2 del Material y Métodos) en poblaciones celulares de $\sim 10^6$ células.

En la Tabla 17 y Figura 82, se muestran los resultados obtenidos. Como se puede observar, la cantidad de dos de estas moléculas (GSH y T[SH]₂) se mantienen constantes durante el inicio de la curva de crecimiento (fase de latencia y crecimiento acelerado) (Tabla 17 y Figura 82), lo que abarca aproximadamente las 10 primeras horas. Entre las 10 y las 18 h existe un incremento de ~ 3 veces la cantidad de GSH y ~ 2 veces la del T[SH]₂, lo que coincide con el inicio de la fase exponencial y mantiene hasta la fase estacionaria (30 h) (Figura 82). Avanzada la fase estacionaria, los niveles de GSH se mantienen pero no así los niveles de T[SH]₂, que disminuyen a la mitad. Por el contrario, los niveles de Gsp inicialmente se mantienen muy bajos (< 1 nmol) durante las primeras 18 h, disminuyendo aún más en el inicio de la fase exponencial y la estacionaria. En cualquier caso, el GSH (y por lo tanto el GSH total) es la molécula tiólica que presenta una mayor abundancia a lo largo de todo el crecimiento (Tabla 17, Figura 82).

		Fase de la curva de crecimiento					
		Latencia		Crecimiento acelerado	Fase exponencial	Crecimiento retardado	Estacionaria
Tiempo (h)		0,5	4	10	18	30	48
Nº células/ml		5×10^3	2×10^4	6×10^4	2×10^5	7×10^5	6×10^5
Cantidad de tioles (nmol/ 10^6 células)	GSH	$2,00 \pm 0,5$	$2,36 \pm 0,17$	$1,91 \pm 0,40$	$6,29 \pm 1,36$	$6,50 \pm 1,49$	$6,29 \pm 1,14$
	Gsp	$0,27 \pm 0,24$	$0,56 \pm 0,10$	$0,68 \pm 0,15$	$0,08 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,01$
	T[SH] ₂	$1,65 \pm 0,21$	$1,22 \pm 0,02$	$1,18 \pm 0,26$	$2,43 \pm 0,58$	$2,26 \pm 0,20$	$1,21 \pm 0,49$
	Glutatión total	$4,92 \pm 0,28$	$5,36 \pm 0,17$	$4,94 \pm 0,65$	$11,24 \pm 2,39$	$11,08 \pm 1,16$	$8,77 \pm 0,19$

Tabla 17. Valoración cuantitativa de algunos compuestos tiólicos determinados por HPLC durante diferentes fases de la curva de crecimiento del ciliado *T. thermophila*. GSH: glutatión reducido, Gsp: glutatiónilperimidina, T[SH]₂: tripanotión reducido.



7.2.2 Biosíntesis de T[SH]₂ bajo diferentes tratamientos inductores de la expresión del gen *TtGspS4*.

Como complemento a los experimentos anteriores y conociendo que al menos uno de los genes *TtGspSs* (*TtGspS4*) (Figura 80) induce su expresión significativamente por Cu²⁺, Zn²⁺ y el agente oxidante CDNB, se llevaron a cabo medidas de T[SH]₂ por HPLC en extractos celulares de poblaciones de *T. thermophila* tratadas previamente con Cu²⁺ (0,4 mM), Zn²⁺ (3,5 mM) o CDNB (0,2 mM) durante 2 h y en controles (no tratados). A diferencia de los experimentos anteriores, el monobromobimano no se detectó por fluorescencia sino por absorbancia a 340 nm. Los resultados obtenidos se muestran en los cromatogramas de la Figura 83 y en la Tabla 18. Todos los picos detectados en las muestras (tanto control como tratadas) que presumiblemente fueron identificados como T[SH]₂ eluyen alrededor de los 42 min, a diferencia del T[SH]₂ comercial que eluye aproximadamente 2 min antes (Figura 83, Tabla 18). El tratamiento con Cu, es el que provoca una mayor cantidad de T[SH]₂, unas 7 veces más que los niveles basales (del control) (Figura 83, Tabla 18). El Zn provoca un incremento de T[SH]₂ aproximadamente el doble que el control, y tras tratamiento con CDNB los niveles de T[SH]₂ se mantienen similares a los del control (Figura 83, Tabla 18).

Resultados

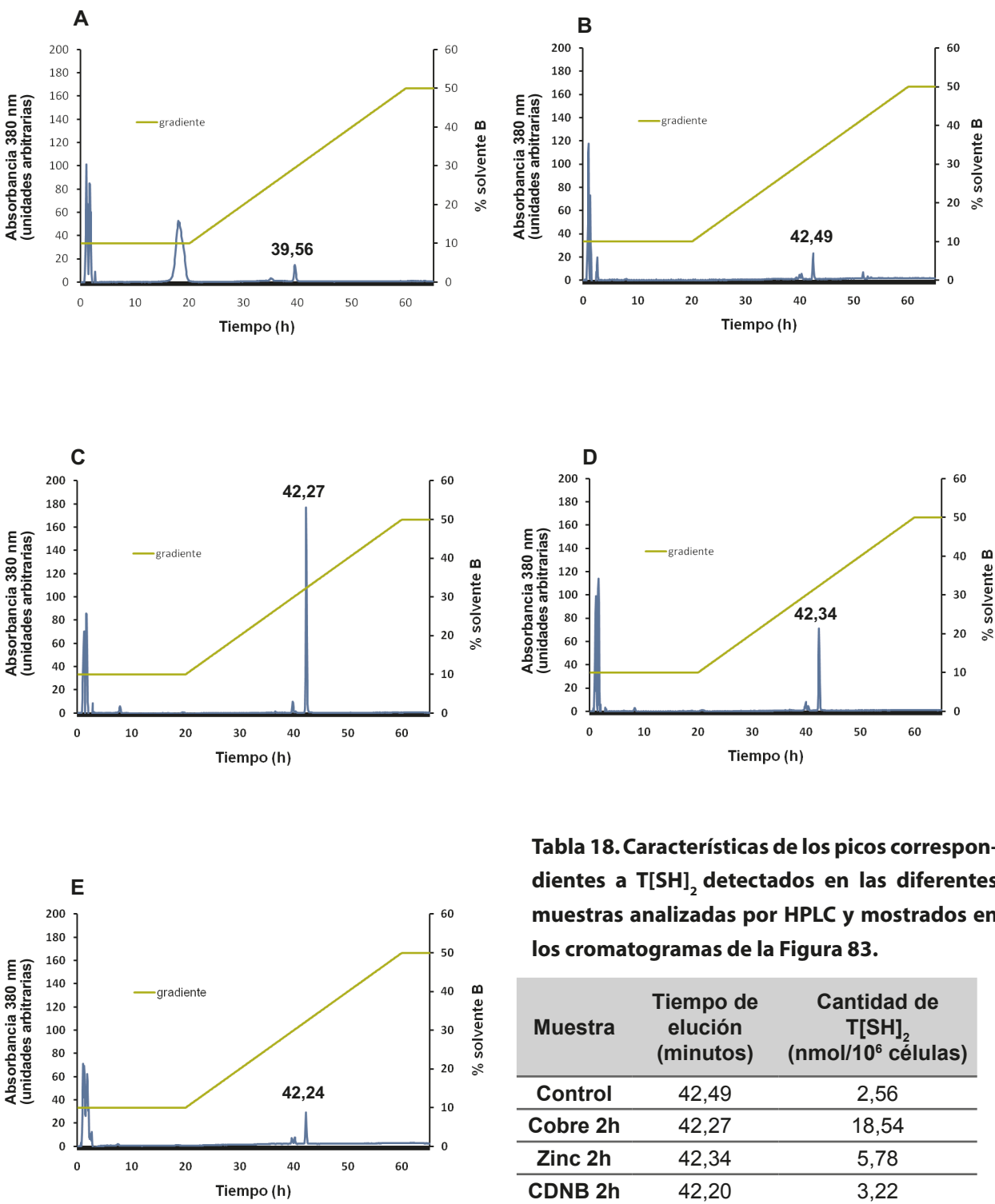


Tabla 18. Características de los picos correspondientes a T[SH]₂ detectados en las diferentes muestras analizadas por HPLC y mostrados en los cromatogramas de la Figura 83.

Muestra	Tiempo de elución (minutos)	Cantidad de T[SH] ₂ (nmol/10 ⁶ células)
Control	42,49	2,56
Cobre 2h	42,27	18,54
Zinc 2h	42,34	5,78
CDNB 2h	42,20	3,22

Figura 83. Cromatogramas de la separación por HPLC de grupos tiólicos (detección de T[SH]₂ obtenidos de extractos celulares de poblaciones de *T. thermophila*, previamente sometidos a distintos tratamientos, para la detección de T[SH]₂. A: patrón con T[SH]₂ comercial, B: control, C: tratamiento con Cu²⁺ (0,4 mM), D: tratamiento con Zn²⁺ (3,5 mM), E: tratamiento con CNDP (0,2 mM). La línea verde representa el gradiente del porcentaje de solvente B presente a lo largo del tiempo de elución. Los datos de elución y concentración estimada se muestran en la Tabla 18.

7.3 Determinación por espectrometría de masas del pico denominado T[SH]₂.

Para comprobar que efectivamente el pico denominado T[SH]₂ era efectivamente tripanotión, se analizó una alícuota de los picos obtenidos en el HPLC (de la muestra control y la tratada con Cu²⁺ (0,4 mM, 2 h)), por espectrometría de masas. En la Figura 84 se muestran los resultados obtenidos del MALDI-TOF, tanto del patrón comercial (espectro A) como de la muestra control (espectro B) y el tratamiento con cobre (espectro C). Tanto en el patrón comercial de T[SH]₂ como en la muestra control de *T. thermophila* se detecta tripanotión unido a dos moléculas de bimano T(S-bimano)₂ con una masa de 1.104,5787 (Figura 84A) y 1.104,5081 m/z (Figura 84B), respectivamente. El pico de 914,4827 m/z en el patrón y 914,4212 m/z de la muestra control de *T. thermophila* corresponde al conjugado de tripanotión con una molécula de bimano T(S-bimano). Estos picos son ligeramente diferentes en la muestra de Cu²⁺, en la cual el pico correspondiente a T(S-bimano)₂ tiene un valor de 1.118,3208 m/z y el pico de tripanotión con una molécula de bimano T(S-bimano) de 928,2800 (Figura 84C). El disulfuro de tripanotión (T[S]₂) tiene un valor de 722,3739 m/z en el estándar comercial (Figura 84A), 721,2940 m/z en la muestra control de *T. thermophila* (Figura 84B) y 721,1947 en la muestra de cobre. (Figura 84C)

8. RECICLAJE DE TRIPANOTIÓN: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA TRI-PANOTIÓN REDUCTASA.

Los resultados previos indican que en el ciliado *T. thermophila* coexisten ambas moléculas, tanto glutatión como tripanotión. Ambas moléculas pueden pasar de un estado reducido a un estado oxidado en presencia de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS, NOS), por lo que para pasar, de nuevo, a una forma funcionalmente activa, deben volver a reducirse. Estas reacciones de reciclaje o reducción están catalizadas por las enzimas glutatión reductasa (GR) o tripanotión reductasa (TryR), respectivamente. Como una prueba adicional de la existencia de tripanotión en este microorganismo, hemos estudiado la presencia y actividad de la enzima TryR en *T. thermophila*, utilizando la actividad GR como control. Para ello se ha valorado espectrofotométricamente ($\lambda = 340$ nm) la actividad oxidorreductasa en extractos celulares de poblaciones de *T. thermophila* en presencia de diferentes sustratos y NADPH. La adición del lisado de *Tetrahymena*, provoca un descenso inicial de la absorbancia, debido a que dicho extracto celular contiene sustratos muy diversos, que se están reduciendo y consumen NADPH, como donador electrónico (Figura 85B y C). A esta actividad reductasa heterogénea basal, se le denomina actividad de fondo. Posteriormente, se añade el sustrato específico (tripanotión oxidado, T[S]₂) para la actividad oxidorreductasa que queremos valorar, en nuestro caso, tripa-

Resultados

Resultados

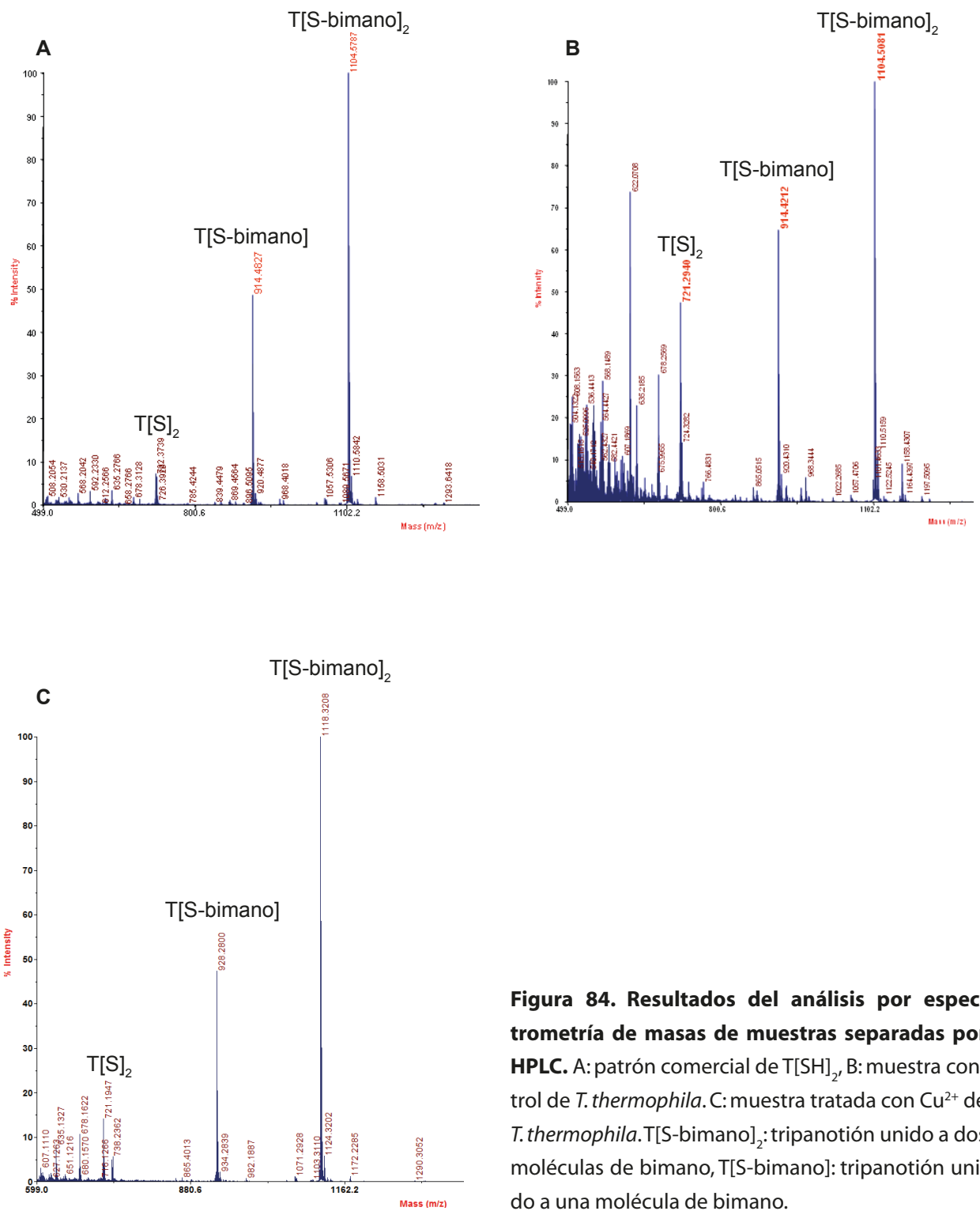


Figura 84. Resultados del análisis por espectrometría de masas de muestras separadas por HPLC. A: patrón comercial de T[SH]₂, B: muestra control de *T. thermophila*. C: muestra tratada con Cu²⁺ de *T. thermophila*. T[S-bimano]₂: tripanotión unido a dos moléculas de bimano, T[S-bimano]: tripanotión unido a una molécula de bimano.

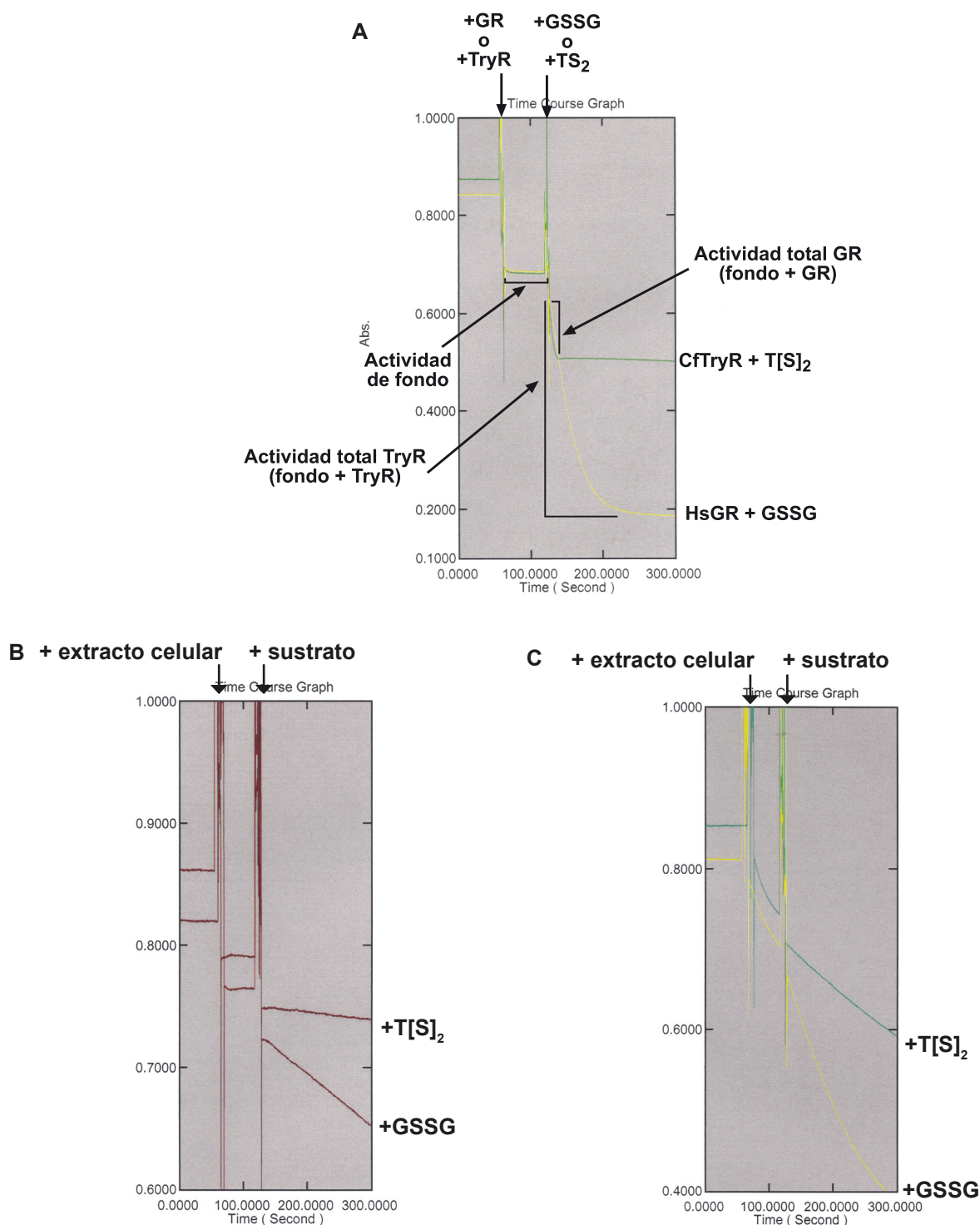


Figura 85. Monitorización de la actividad oxidoreductasa (consumo de NADPH), correspondiente a glutatión reductasa (GR) o alternatively, tripanotión reductasa (TryR), presentes en extractos celulares de *T. thermophila*. En el eje de ordenadas se indica la absorbancia a 340 nm y en el de abcisas el tiempo (s). A: Controles con actividades enzimáticas ya conocidas. La línea amarilla representa el control con la enzima recombinante HsGR (glutatión reductasa de *Homo sapiens*) y la verde corresponde al control con la enzima CfTryR (triptanotión reductasa de *Crithidia fasciculata*). Inicialmente se determina la absorbancia de una mezcla que contiene NADPH, seguidamente se incorpora la enzima HsGR (línea amarilla) o la enzima CfTryR (línea verde). B: actividad oxidoreductasa de 5 µl de un extracto celular de *T. thermophila*. C: actividad oxidoreductasa de 25 µl de un extracto celular de *T. thermophila*

Resultados

notión reductasa (TryR) (Figura 85). A modo de control, igualmente, se ha valorado la actividad GR, utilizando glutatión oxidado (GSSG) como sustrato (Figura 85). En ambos ensayos, control (actividad GR) y problema (actividad TryR), cuando se añade el sustrato correspondiente (GSSG o T[S]₂), se produce un descenso en la absorbancia, lo que indica un incremento en el consumo de NADPH. En esta segunda bajada, estamos midiendo tanto la reducción del sustrato objeto de estudio (T[S]₂ o GSSG) como la actividad de fondo (Figura 85). Por lo tanto, a la medida obtenida en cada caso tendremos que restar, la actividad de fondo, para obtener la actividad enzimática debida a la reducción del sustrato adicionado.

Los resultados de las actividades oxidorreductasas (GR y TryR) en los extractos celulares de *T. thermophila* derivados de poblaciones previamente tratadas con metales o CDNB y control, se muestran en los histogramas de la Figura 86. Con respecto a la actividad GR (Figura 86), los valores significativamente diferentes respecto del control fueron aquellos correspondientes a los tratamientos con Cu²⁺ o Zn²⁺. Aunque los niveles detectados son (en general) menores que los correspondientes a la actividad GR, también existe actividad TryR en los extractos celulares de *T. thermophila* (Figura 86). En este caso, el único valor de actividad TryR significativamente ($p > 0,05$) diferente respecto del control, es el tratamiento con Cu²⁺ ($46,85 \pm 11,16$ nmol/min/mg), aproximadamente el doble que el valor promedio obtenido en el control ($21,85 \pm 1,64$ nmol/min/mg) (Figura 86, Tabla 19).

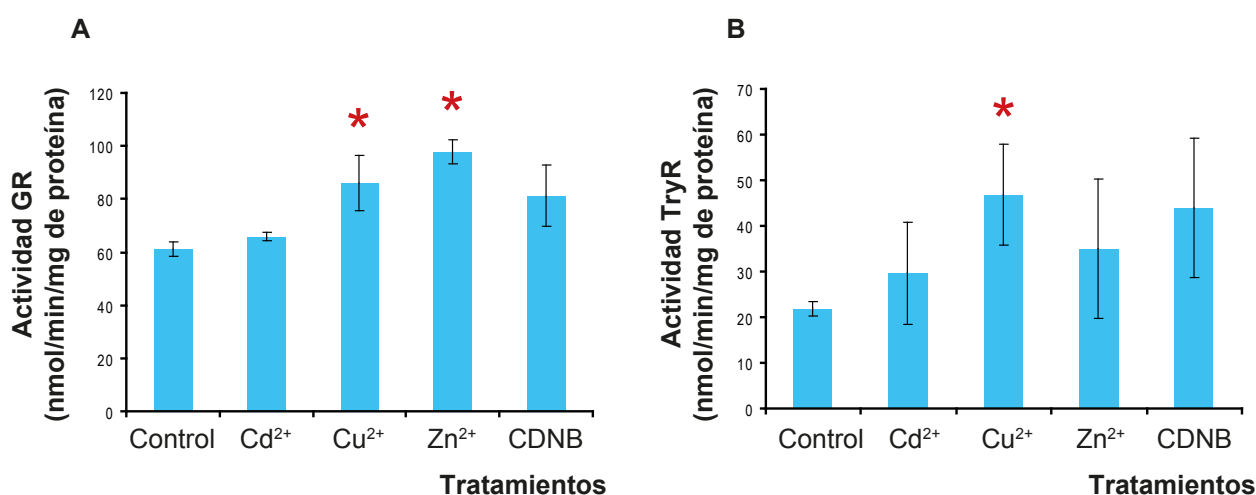


Figura 86. Actividades oxidorreductasas (GR y TryR) obtenidas a partir de extractos celulares de *T. thermophila* procedentes de muestras tratadas con diversos metales pesados (0,044 mM Cd²⁺, 0,4 mM Cu²⁺, 3,5 mM Zn²⁺) o CDNB (0,2 mM) durante 2 horas y control (sin tratamiento). A: actividad GR, B: actividad TryR. El asterisco indica los valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) respecto al control.

Muestra	Actividad GR			Actividad TryR		
	A	ds	valor-p	A	ds	valor-p
Control	61,22	2,79		21,85	1,64	
Cadmio	65,82	1,64	0,213	29,62	11,30	0,356
Cobre	86,01	10,48	0,045	46,85	11,16	0,018
Zinc	97,77	4,40	0,002	35,00	15,19	0,272
CDNB	91,23	11,42	0,084	43,97	15,27	0,287

Tabla 19. Valores numéricos de las actividades oxidorreductasas (GR y TryR) obtenidas a partir de extractos celulares de *T. thermophila* procedentes de muestras tratadas con diversos metales pesados (0,044 mM Cd²⁺, 0,4 mM Cu²⁺, 3,5 mM Zn²⁺) o CDBN (0,2 mM) durante 2 horas y control (sin tratamiento). A: actividad en nmol/min/mg de proteína de extracto procedente de las diferentes muestras, ds: desviación estándar. n (número de ensayos)=3.

Introducción

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Resumen de resultados

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

Introducción

Objetivos

Materiales y
Métodos

Resultados

Discusión

Resumen de
resultados

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

Discusión

1. BIOTOXICIDAD DE METALES Y OTROS AGENTES ESTRESANTES. Efecto de la inhibición de la biosíntesis de GSH o bloqueo de grupos tiólicos. Valoración de la mortalidad celular/grupos tiólicos/glutación total.

Para analizar, de manera indirecta, la importancia relativa del tripéptido glutatión (GSH) en la respuesta al estrés originado por ciertos agentes tóxicos, se expusieron a las poblaciones del ciliado *Tetrahymena thermophila* a ciertos compuestos, como butionilsulfoximina (BSO) o bien, N-etilmaleimida (NEM), conjuntamente con la exposición a dichos agentes estresantes. Hay que recordar que el BSO es un inhibidor específico de la γ -glutamylcisteina ligasa (GCL), enzima que cataliza la primera etapa de la biosíntesis de GSH, que es la más importante y limitante del proceso (Griffith, 1982; 1999). La NEM es un agente electrofílico menos específico, que es capaz de interaccionar y por tanto bloquear los grupos tiólicos, principalmente de los restos de cisteína de proteínas y péptidos. Altera e inhibe la actividad de estas proteínas, especialmente de aquellas ricas en grupos tiólicos, como las metalotioneínas (MTs) y las relacionadas con el metabolismo del glutatión y la tiorredoxina. El GSH interviene de manera importante en el proceso de detoxificación de estas proteínas, ya que sus grupos tiólicos interaccionan con las moléculas de NEM y las inmovilizan, impidiendo su interacción con proteínas más relevantes (Giustarini *et al.*, 2000; Bowes and Gupta 2005).

Como era de esperar, el grado de citotoxicidad de los distintos agentes estresantes sobre el ciliado *T. thermophila* varía, dependiendo de la naturaleza del mismo. Además, el efecto tóxico de cada estresante es variable, según la concentración y el tiempo de exposición aplicados. En muchos casos, se observa que el tratamiento durante 24 h con una concentración determinada de tóxico causa una elevada mortalidad celular, mientras que apenas existe citotoxicidad, cuando la exposición, a la misma concentración metálica, es tan sólo de 2 h. Así, a las concentraciones ensayadas, no se obtiene un nivel de mortalidad significativamente mayor, con respecto

a las poblaciones control, en el caso de los tratamientos cortos (2 h) con metales no esenciales (Cd^{2+} o As^{5+}) y el herbicida paraquat (PQ) (Tablas F23B, F25B, F27B, F29B, F31B, F35B). En estos tratamientos cortos, los resultados se siguen manteniendo, cuando se induce una inhibición de la biosíntesis de GSH con BSO (Tablas F23B, F27B, F31B) o bien, se bloquean grupos tiólicos con NEM (Tablas 25B, 29B, 33B). Una excepción, son las exposiciones de 2 h con menadiona (MD) cuyo efecto celular será comentado en profundidad más adelante.

El Cd^{2+} es un metal no esencial muy tóxico para los seres vivos, incluso a concentraciones muy bajas. Por esta razón, se considera como uno de los contaminantes más tóxicos y peligrosos en la legislación de la UE, y ocupa el octavo lugar de la lista de contaminantes ambientales prioritarios en la legislación de EEUU (<http://www.atsdr.cdc.gov>). Se han postulado varios mecanismos directos e indirectos para explicar la biotoxicidad de este metal y su demostrada capacidad mutagénica y carcinogénica en animales (Valko *et al.*, 2005; 2006; Thévenod 2009; Joseph 2009). Uno de los principales mecanismos implicados en la toxicidad del Cd^{2+} parece ser la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y como consecuencia de ello, la inducción de estrés oxidativo (Liu *et al.*, 2009; Cuypers *et al.*, 2010).

Al igual que en otros sistemas biológicos, tanto unicelulares como pluricelulares, en *T. thermophila* y en otras especies de ciliados hemos detectado que el Cd^{2+} es capaz de generar diversos tipos de ROS, como superóxido y peróxidos y, por tanto, anión hidroxilo (Gallego *et al.*, 2007; Rico *et al.*, 2009). Los resultados han mostrado que, a exposiciones cortas (2 h), este metal (Cd^{2+}) apenas causa mortalidad celular (Figura 23). Sin embargo, a exposiciones prolongadas (24 h) y la misma concentración, puede alcanzarse un elevado grado de mortalidad. Claramente se observa que el patrón de citotoxicidad del Cd^{2+} en *T. thermophila* no sigue la clásica relación dosis-efecto, característica de células animales (Tabla F24B, Figura 24). En este caso, no hay una relación directamente proporcional entre ambos parámetros, sino que los niveles de toxicidad permanecen relativamente bajos (inferiores al 20 % de la población) hasta que a partir de una concentración determinada se produce un incremento drástico de la mortalidad, que alcanza valores superiores al 90 % de la población. Estos resultados ecotoxicológicos ratifican nuestros datos anteriores (Gallego *et al.*, 2007) con respecto al modelo de citotoxicidad de Cd^{2+} en este mismo microorganismo eucariota. El efecto tóxico del Cd^{2+} parece ser contrarrestado por las defensas celulares microbianas, hasta que se alcanza una cierta concentración de metal, a partir de la cual, se sobrepasa el nivel de detoxificación metálica en la mayoría de células de la población, lo que causa un descenso drástico de la viabilidad celular.

En los experimentos de inhibición de la biosíntesis de GSH se observa que; la presencia de BSO disminuye casi a la mitad la mortalidad celular, cuando las células son expuestas a la

concentración más elevada de metal (1,76 μM) (Tabla F24B). Por tanto, un descenso en los niveles intracelulares de GSH, parece incrementar la resistencia celular a Cd^{2+} . Sin embargo, esta drástica disminución de la mortalidad no se produce, cuando las poblaciones tratadas con esa elevada concentración metálica (1,76 μM) son expuestas a NEM, agente bloqueante de grupos tiólicos libres. Además, la exposición a NEM causa un aumento de la mortalidad celular en presencia de una concentración menor de Cd^{2+} (1,54 μM). De tal manera que en estas condiciones, la mortalidad celular en las poblaciones es más de cinco veces superior a la de las poblaciones control, que han sido tratadas con la misma concentración metálica, pero no han sido expuestas a este alquilante tiólico (NEM). Diversos estudios han mostrado que el estrés oxidativo, como consecuencia de la generación directa de ROS e indirecta por el consumo de antioxidantes celulares, son importantes mecanismos implicados en la biotoxicidad del Cd^{2+} , aunque no son los únicos (Liu *et al.*, 2009). En la mayoría de los seres vivos se sintetizan dos principales tipos de moléculas en respuesta al estrés oxidativo, causado por la presencia de Cd^{2+} ; el tripéptido glutatión y sus derivados (tripanotión, ovotiol, fitoquelatinas, etc) y metalotioneinas (MTs). El glutatión y sus derivados pueden representar hasta un 90 % de los antioxidantes celulares totales (Wysocki and Tamás, 2010). Las MTs presentan dos principales mecanismos de defensa frente a este metal pesado; por una parte, pueden ser antioxidantes siendo capaces de interaccionar directamente con ROS y RNS (*Reactive Nitrogen Species*), generados por el metal. Y, por otra parte, las CdMTs pueden inmovilizar directamente cationes Cd^{2+} , disminuyendo su biodisponibilidad y como consecuencia, su capacidad de interaccionar con moléculas y estructuras biológicas (Klaassen *et al.*, 2009; Chiaverini and De Ley, 2010). Por esta razón, el Cd^{2+} inmovilizado carece de toxicidad celular.

Existe una cierta controversia sobre el papel de las MTs en condiciones de ausencia o limitación de GSH y en presencia de Cd^{2+} u otros agentes oxidantes. Algunos autores, utilizando células animales o levaduras, han comprobado que un tratamiento con BSO incrementa la sensibilidad celular a metales y otros agentes oxidantes (Dusre *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 2003; Nargund *et al.*, 2003). Por el contrario, en otros estudios con células animales, la eliminación ó limitación de GSH genera mayor resistencia al efecto letal del Cd^{2+} o a las condiciones de estrés oxidativo generadas por otros agentes tóxicos. Según algunos autores, este hecho detectado en animales vertebrados e invertebrados, parece ser debido a un incremento en la formación de MTs específicas (CdMTs), que actúan como antioxidantes y son capaces de interaccionar con el sistema GSH/GSSG (Nielsen *et al.*, 2007; Shimitzu *et al.*, 1998; Haïdara *et al.*, 1999; Zaroogian and Jackim, 2000; Min *et al.*, 2005; Ivanina *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2008a). Además, se ha comprobado que ratones *knockout* en genes codificantes de MTs son muy sensibles al estrés oxidativo,

lo que pone de manifiesto la importancia de estas proteínas en la protección *in vivo* frente a este tipo de estrés celular (Conrad *et al.*, 2000).

De acuerdo con los resultados obtenidos, parece ser que el GSH es un antioxidante muy importante para la detoxificación de Cd^{2+} en el protozoo ciliado *T. thermophila*. Al igual que en otros organismos/microorganismos, esta molécula intervendría de manera eficaz cuando las células son expuestas tanto a tratamientos cortos como más prolongados de Cd^{2+} , pero a bajas concentraciones. Sin embargo, cuando las exposiciones al metal son de 24 h a concentraciones metálicas más elevadas y se ha inhibido experimentalmente la biosíntesis de GSH con BSO, las CdMTs tendrían un papel importante en esta respuesta frente al Cd^{2+} . Así, utilizando el fluoróforo CMFDA se detecta un aumento de la fluorescencia en todas las poblaciones expuestas al metal (durante 2 h), con respecto a las poblaciones control sin tratamiento metálico (Tablas F23A y F24A), lo que correspondería a un aumento en los niveles de glutatión. Por el contrario, cuando las células han sido sometidas a un tratamiento con BSO, la fluorescencia detectada en todas las poblaciones con doble tratamiento (BSO + Cd^{2+}) es inferior, debido a que estas poblaciones son incapaces de biosintetizar *de novo* GSH, respecto a las poblaciones control, que sólo han recibido la exposición al metal. Sin embargo, estas poblaciones que han recibido doble tratamiento emiten más fluorescencia que las poblaciones control tratadas con BSO, pero que no han entrado en contacto con Cd^{2+} (Tabla F24A). Este resultado podría tener dos explicaciones:

1) que las células tratadas con BSO pudieran aún sintetizar GSH, cuando se encuentran en situación de estrés oxidativo por el metal, o

2) que el fluorocromo utilizado (CMFDA) no marque exclusivamente GSH. El BSO es considerado un buen inhibidor, pero numerosos estudios apuestan por la inespecificidad del fluorocromo empleado, de tal forma, que se piensa que el CMFDA podría igualmente unirse a diversas moléculas ricas en grupos tiólicos diferentes al GSH (Tauskela *et al.*, 2000; Sebastia *et al.*, 2003; Jos *et al.*, 2009). Desafortunadamente, aún no existe un fluorocromo con especificidad exclusiva por el glutatión.

La aplicación de NEM, no causa un bloqueo total de todos los grupos tiólicos, pero demuestra ser un agente bastante eficaz. Cuando comparamos cada población tratada con NEM, con respecto su control correspondiente (sin tratamiento metálico ó en presencia de la misma concentración metálica, pero sin NEM), siempre se detecta una mayor fluorescencia en el control (Tablas F25A y F26A), con independencia de la concentración y duración (2 ó 24 h) de la exposición a Cd^{2+} . En general, la presencia de NEM lleva consigo un aumento de la mortalidad

celular en las diferentes concentraciones metálicas utilizadas, y dicho incremento se corresponde, consecuentemente, con un descenso en la fluorescencia (CMFDA) que detecta GSH (Tablas F25A y F26B).

El método enzimático de valoración de glutatión utilizado, sólo valora la cantidad total de GSH libre, independientemente de que se encuentre en forma reducida u oxidada. Por esta razón, no es sorprendente que existan pocas diferencias, con respecto a este parámetro, entre poblaciones tratadas y controles. Estos resultados se mantienen, cuando se inhibe la biosíntesis de GSH con BSO, aunque en este caso, sí se detecta una disminución en los niveles de glutatión en las poblaciones control (sin metal + BSO) (Figura 40). Los tratamientos con NEM siempre ocasionan una disminución de los niveles totales de glutatión, tanto en poblaciones control (sin Cd^{2+}) como en aquellas sometidas a una exposición con Cd^{2+} . Este descenso en GSH tiene un valor similar en poblaciones expuestas al metal (2 ó 24 h), luego el tiempo de tratamiento no parece afectarlo.

En conjunto, los datos parecen indicar que en la respuesta estrés al Cd^{2+} el ciliado *T. thermophila*, además de la implicación del GSH, principalmente en la respuesta inmediata o temprana, pueden intervenir CdMTs (Cd-metalotioneínas). Actualmente, conocemos la existencia de 3 CdMTs (MTT1, MTT3 y MTT5) en *T. thermophila* (Díaz *et al.*, 2007; Amaro *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2009; 2011). Estas proteínas, ricas en residuos de cisteína (48, 42 y 24 residuos, respectivamente), son inusualmente largas si las comparamos con las CdMTs de mamíferos, y por tanto, tiene una mayor capacidad de unir una mayor cantidad (8-19) de cationes Cd^{2+} , respecto de las MT estándar (7 cationes Cd^{2+}) (Gutiérrez *et al.*, 2011). Mediante RT-PCR cuantitativa, se ha comprobado que la expresión de los genes MTs de *T. thermophila* es fuertemente inducida por Cd^{2+} (entre otros metales), estando este metal pesado entre los primeros en el ranking de inducibilidad (Gutiérrez *et al.*, 2011). La formación de estas CdMTs podría explicar el notable incremento (respecto del control) de grupos tiólicos (fluorescencia con CMTDA), detectado cuando se exponen las poblaciones a Cd^{2+} .

El As^{5+} es un contaminante ambiental de amplia distribución, que se encuentra en diversas formas químicas con diferente toxicidad. En general, las formas inorgánicas de arsénico, arseniato (As^{5+}) o arsenito (As^{3+}) son más tóxicas que las orgánicas (Jomova *et al.*, 2010; Ventura-Lima *et al.*, 2011) y dentro de las inorgánicas, la forma más reducida (As^{3+}), es la que presenta mayor biotoxicidad (Shi *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2005).

Los resultados de las exposiciones de *T. thermophila* a arseniato muestran que, la mortalidad de las poblaciones celulares, bajo cada concentración metálica, es semejante, tanto en

presencia, como en ausencia de inhibidores. Este hecho se cumple con independencia de la naturaleza del inhibidor; ya sea de la síntesis de GSH, como BSO o bien, quelante de grupos –SH, como NEM y de la duración del tratamiento. Sin embargo, en todos los casos, las exposiciones, a cada concentración de tóxico, durante 24 h, produjeron mucha mayor mortalidad que las de 2 h (Tablas F27B, F28B, F29B, F30B). Estos resultados podrían tener varias explicaciones. Apparently, se podría concluir que el tripéptido glutatión y otros compuestos, proteicos y no proteicos, ricos en grupos tiólicos no son importantes en la respuesta de *Tetrahymena* frente al arseniato. Sin embargo, esta afirmación contradice los datos de expresión de genes codificantes de algunas glutatión transferasas, glutatión reductasa y glutamato cisteína ligasa (que se describen en esta tesis) y metalotioneínas (Díaz *et al.*, 2007), cuya transcripción es inducida notablemente en presencia de arseniato. Por otra parte, hay que descartar que, los inhibidores utilizados y a la concentración aplicada, podrían no ejercer una inhibición total de la biosíntesis de glutatión o bloqueo funcional completo de los grupos tiólicos quelantes de metal. Debido a la elevada citotoxicidad y genotoxicidad de este elemento, *Tetrahymena* como otros muchos organismos, parece presentar múltiples sistemas de resistencia a diferentes formas químicas de arsénico, incluido arseniato inorgánico (Rosen, 2002; Páez-Espino *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2009). En eucariotas, el arseniato (As^{5+}) entra en las células parasitando transportadores de fosfato (Zhao *et al.*, 2009). Una vez en el citoplasma, es reducido a arsenito (As^{3+}) por una arseniato reductasa. Esta modificación por reducción, que puede ser aparentemente contradictoria ya que el arsenito es una forma al menos 100 veces más tóxica que el arseniato, hace que sea mucho más reactiva y por tanto fácil de acomplejar (Tsai *et al.*, 2009). Se han caracterizado varias arseniato reductasas, unas dependientes de glutatión y otras de tiorredoxinas (Rosen, 2002; Mesen and Silver 2006). Finalmente, el arsenito es expulsado al exterior celular por dos vías alternativas; mediante una ATPasa de membrana o bien, por una proteína transportadora de tipo ABC (Tsai *et al.*, 2009). Alternativamente, el arsenito puede ser bioacumulado, al ser quelado intracelularmente por ciertos ligandos ricos en grupos tiólicos de distinta naturaleza, según el organismo/microorganismo, como glutatión, fitoquelatinas y metalotioneínas. Los cationes metálicos inmovilizados pueden ser expulsados al exterior o permanecer en el citoplasma directamente o en el interior de una vacuola (Páez-Espino *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2009). Por último, el arsénico puede ser biotransformado metabólicamente por microorganismos, distinguiéndose cuatro procesos principales; metilación, desmetilación, oxidación y reducción (Stolz *et al.*, 2006). De estos procesos, el más importante es la biometilación, que puede ser llevado a cabo por bastantes especies biológicas de toda la escala evolutiva, desde procariotas hasta el hombre, el arsenito es metilado intracelularmente hasta ácido monometilarsónico (MMA V) o ácido dimetilarsínico

(DMA V), que son mucho menos biotóxicos. Algunos de los intermediarios generados en este proceso de biometilación son gaseosos y por tanto, pueden desaparecer del medio. En este caso, la biotransformación se suele denominar biovolatilización (Bentley and Chasteen 2002; Thomas *et al.*, 2004). En algunos organismos, también puede producirse una trimetilación, generándose compuestos arsenicales más reactivos y además cancerígenos (Jomova *et al.*, 2010). En *T. thermophila*, se ha mostrado recientemente que este microorganismo eucariota es capaz de reducir arseniato a arsenito y expulsarlo, y además puede biometilarlo aunque la generación de formas volátiles es escasa (Yin *et al.*, 2011). En conclusión, *Tetrahymena* parece disponer de múltiples mecanismos de resistencia a arsénico, que actuarían de manera conjunta o alternativa para evitar la muerte celular.

El paraquat (PQ) es un herbicida no selectivo de amonio cuaternario, que se ha aplicado profusamente en el pasado para el control de malas hierbas. Aunque todavía se utiliza en muchos países, su utilización está prohibida en la Unión Europea, desde el año 2004. El mecanismo de toxicidad del PQ todavía no está dilucidado completamente. En general, se admite que inhibe la reducción de NADP hasta NADPH durante la fotosíntesis, generándose principalmente, anión superóxido, entre otras especies reactivas de oxígeno. Se considera que la generación de ROS sería el principal fenómeno responsable de su biotoxicidad (Suntres, 2002; Jamers and De Cohen, 2010). Además, en células de mamífero, se ha demostrado que este herbicida produce peroxidación lipídica (Huang *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2007) y genera NO lo que parece potenciar su biotoxicidad, aunque los datos experimentales sobre el efecto nocivo del NO son contradictorios (Morán *et al.*, 2010). La producción de ROS, RNS y peroxidación lipídica ocasiona graves daños mitocondriales, que según algunos autores serían responsables de la muerte celular (Mohammadi-Bardbori and Ghazi-Khansari, 2008; González-Polo *et al.*, 2007; Castello *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que el PQ genera diversos tipos de ROS, al menos en animales y plantas, se le atribuye un papel fundamental al GSH en la respuesta celular frente al estrés originado por este agente tóxico (Nakagawa *et al.*, 1995; Bayoumi *et al.*, 2000; Suntres, 2002; Farmen *et al.*, 2010). Sin embargo, en *T. thermophila*, que según hemos podido comprobar muestra una resistencia inusualmente elevada al PQ (datos no mostrados), el GSH no parece presentar un papel relevante en la respuesta frente a este agente tóxico. Así, la inhibición de la biosíntesis de este antioxidante con BSO, no causa variaciones en la mortalidad respecto de aquel sin BSO, cuando las poblaciones celulares se exponen durante 2 h a PQ. Aunque sí se detecta un mayor descenso de grupos tiólicos en presencia de PQ + BSO (Tablas F31A y B). Además, sorprendentemente, en los tratamientos de 24 h, hay un menor incremento de la mortalidad celular en presencia del BSO, pero sólo a ciertas concentraciones (2,5 y 5 mM), a pesar de que en presencia de BSO sí se

detecta un mayor descenso en el contenido celular en grupos tiólicos (Tablas F31A y F32A) a 2 h de exposición, mientras que a 24 h se mantienen los mismos niveles que los controles (en presencia de BSO). Aunque existen todavía pocos estudios publicados en mamíferos, en estos organismos la presencia de BSO causa un drástico aumento en la citotoxicidad del PQ (Nakagawa *et al.*, 1995). La participación escasa o accesorio del GSH como antioxidante frente al PQ en este ciliado, se vuelve a poner de manifiesto en los resultados obtenidos en presencia de NEM. La presencia del bloqueante de grupos -SH (NEM) no incrementa significativamente la mortalidad celular inducida por PQ, tanto a 2 h como a 24 h. Por el contrario, la presencia de NEM disminuye más la presencia de grupos -SH, respecto de los tratamientos con PQ sin NEM. Estos resultados en *T. thermophila*, concuerdan con los datos obtenidos en otros apartados de este trabajo. La presencia de PQ induce la expresión de los genes codificantes para la glutatión cisteína ligasa y algunas glutatión S-tranferasas, pero no induce la formación de glutatión reductasa, enzima implicada en el reciclaje de glutatión. Sin embargo, el PQ produce una buena inducción (x19) de la expresión del gen codificante de una tiorredoxina reductasa (TtTrxR5).

En general, los genes de metalotioneínas (MTs) estudiados en *Tetrahymena* no parecen que se induzcan con PQ de forma significativa, a excepción del gen *MTT5* de *T. thermophila* que se induce unas ~ 6x respecto del nivel basal (Díaz *et al.*, 2007). La inducción de genes *MTs* por PQ se ha detectado en diversos tipos celulares animales (Tomita *et al.*, 2006; Black *et al.*, 2008; Mitsopoulos and Suntres, 2010), incluso se ha caracterizado en el ser humano una nueva isoforma de MT, cuya síntesis es inducida por PQ y, posiblemente, por otros oxidantes (Choi, 2003). La señal desencadenante de la inducción de genes *MTs* parece ser la disfunción o alteración a nivel de mitocondria, uno de los orgánulos diana del efecto tóxico del PQ (Castello *et al.*, 2007; Cochemé and Murphy, 2008; Mohammadi-Bardbori and Ghazi-Khansari, 2008). Esta inducción de MTs parece ser mayor cuando se bloquea la biosíntesis de GSH con BSO (Nakagawa *et al.*, 1998; Maya *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2008).

La MD es un agente oxidante bastante tóxico para *T. thermophila*, de manera que en presencia de una concentración 10 mM la mortalidad celular alcanzada es aproximadamente el 90 % de la población (Tabla F36B). Las poblaciones tratadas con MD + BSO no parecen incrementar más la mortalidad celular de aquellas tratadas sólo con MD, pero sí disminuye más los grupos tiólicos. Igualmente, el NEM tampoco incrementa más la mortalidad celular de *T. thermophila*, pero tampoco disminuye más los grupos -SH respecto del tratamiento con sólo MD.

La MD (2-metil-1,4-naftoquinona) es un compuesto liposoluble, que se utiliza frecuentemente como agente causante o inductor de estrés oxidativo a nivel celular. Su toxicidad radica fundamentalmente en la generación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, aunque

todavía no se conoce con exactitud el/los mecanismo/s implicado/s en su biotoxicidad (Chiou *et al.*, 2003; Franco and Cidlowski, 2012). Esta generación de estrés oxidativo, se suele asociar a procesos de muerte celular por necrosis y más recientemente por apoptosis o autofagia (Gerasimenko *et al.*, 2002; Criddle *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Además, se ha comprobado que, al menos en células animales, la MD es un compuesto potencialmente mutágeno y carcinogénico, que tiene la capacidad de formar pequeñas regiones de ADN monocatenario (Cojocel *et al.*, 2008). Aunque los estudios son escasos y las comparaciones son difíciles de establecer, debido a la falta de uniformidad en las condiciones experimentales, *Tetrahymena* parece ser más resistente a MD que algunas células animales (Yeon and Park, 2005), e incluso que ciertos protistas anaerobios como *Hexamita* y *Giardia intestinalis* (Biagini *et al.*, 2001; Paget *et al.*, 2004). La MD siempre disminuye los niveles de GSH respecto del control, e independientemente de la ausencia o presencia de BSO o NEM.

Es importante señalar que ambos parámetros (contenido en GSH libre y grupos tiólicos) en presencia de concentraciones elevadas de MD, siempre muestran valores inferiores en aquellas poblaciones expuestas a BSO ó NEM, que en las poblaciones no sometidas a estos tratamientos (Tablas F35A, F36A; Figura F46A y B).

De estos resultados podemos afirmar que la exposición a MD origina un consumo de GSH, que podría ser directamente proporcional a la concentración de agente oxidante utilizada. Igualmente, en *T. thermophila* el GSH no parece ser el único antioxidante que interviene en el proceso de detoxificación ó neutralización de la MD. El consumo de GSH en presencia de MD y por tanto, su implicación en la respuesta de defensa celular frente a este agente oxidante parece ser un fenómeno universal en la escala biológica. Diversos estudios realizados con bacterias, hongos filamentosos, levaduras, animales y plantas detectan un descenso en el GSH libre, como consecuencia de la exposición a MD (Liu *et al.*, 1993; Ochi 1996; Zadinski *et al.*, 1998; Smirnova *et al.*, 2000; Mutoh *et al.*, 2005; Poci *et al.*, 2005; Razinger *et al.*, 2010). Incluso, en algunos trabajos se ha utilizado la MD experimentalmente para reducir la cantidad de GSH (Marchionatti *et al.*, 2009). Se han propuesto dos mecanismos distintos, pero no excluyentes, para explicar esta disminución en la concentración de GSH y por tanto explicar la implicación del glutatión en la detoxificación de MD. En primer lugar, la interacción directa del GSH con los radicales libres generados por la exposición a MD (Criddle *et al.*, 2006; Razinger *et al.*, 2010). En segundo lugar, la conjugación directa del GSH con la MD, en un proceso mediado por enzimas glutatión transferasas específicas. Estos conjugados, que se han observado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por microscopía electroquímica de barrido (Mauzeroll and Bard, 2004), son incluidos en una vacuola y permanecen en el citoplasma o bien, son expulsados posteriormente por medio

de una bomba de transporte dependiente de ATP. La formación de conjugados MD-GSH, parece ser el principal mecanismo de detoxificación para la MD en levaduras y conlleva, la inducción de genes codificantes para algunas GSTs (Zadzinski *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2007; 2008). En *T. thermophila* la MD no induce de forma espectacular a ningún gen GST ni tampoco a la GR de este ciliado, pero sí induce de manera llamativa (~123x) el gen codificante de GCL (implicada en la biosíntesis de GSH).

La MD incrementa la expresión de enzimas que generan GSH, como la γ -glutamylcisteí-naligasa (implicada en la primera etapa de la biosíntesis de GSH), y la GR (que reduce el GSSG) en muchos organismos, desde bacterias (Yan *et al.*, 2006) hasta animales (Chiou and Tzeng, 2000; Chuang *et al.*, 2002). También se ha detectado una inactivación de enzimas antioxidantes clave, en presencia de este agente tóxico (McAmis *et al.*, 2003). Un desequilibrio entre la proporción GSH:GSSG es la señal propuesta por algunos autores como provocadora del inicio de la muerte celular por apoptosis y/o necrosis en células animales (Franco and Cidlowski, 2012; Franco *et al.*, 2009). Alternativamente, otros autores sostienen que la MD induce apoptosis al ocasionar una despolarización de la membrana mitocondrial y un incremento de la concentración mitocondrial de Ca^{2+} (Gerasimenko *et al.*, 2002; Baumgartner *et al.*, 2009). En levaduras, se ha comprobado que el contenido intracelular de glutatión reducido es un factor clave para la degradación controlada de mitocondrias, mediante un proceso de autofagia especializada, que recibe el nombre de mitofagia (Deffieu *et al.*, 2009).

Por último, hay que señalar que la acidificación del medio, durante 24 h, no produjo diferencias estadísticamente significativas de mortalidad celular, tanto en aquellas poblaciones expuestas previamente a BSO ó NEM, como en las que no han recibido estos tratamientos (Tablas F37B y F38B). Con respecto al contenido en grupos tiólicos, sólo se aprecia un ligero incremento, pero estadísticamente significativo, en las poblaciones expuestas a un pH ácido (sin BSO), y una disminución cuando se trata con BSO (Tabla F37A y Figura 47A). En presencia de NEM disminuyen los grupos tiólicos, mientras que sin NEM y pH ácido se mantienen igual que el control. Los niveles de GSH se mantienen prácticamente igual (con o sin BSO o NEM) respecto de aquellos que presentan los controles.

Apenas existen estudios relativos al efecto del pH sobre el contenido en GSH, y los escasos publicados son aparentemente contradictorios. En algunas levaduras, como *Candida utilis*, el estrés ácido incrementa la actividad de la γ -glutamylcisteína ligasa, lo que se traduce en un incremento de la cantidad intracelular de GSH, que sólo es transitorio porque en estas condiciones también aumenta la capacidad de expulsión de este tripéptido (Nie *et al.*, 2005; Liang *et al.*,

2008). En *T. thermophila* el gen codificante de la GCL se sobre-expresa (~120x) a pH 5, pudiéndose incrementar así la cantidad de GSH intracelular, lo que estaría de acuerdo con el incremento de grupos tiólicos a pH ácido (sin BSO), pero en contradicción con lo detectado respecto del GSH total (sin BSO), el cual se mantiene igual que los controles. En bacterias, como *Rhizobium tropici*, también se detecta una activación de la síntesis de GSH, en respuesta a un descenso de pH (Muglia *et al.*, 2007). Finalmente, en células animales se ha observado un descenso de GSH tras la acidificación del medio (Ikebuchi *et al.*, 1993; Garcia-Ruiz *et al.*, 2000), que podría deberse a un proceso de glutationilación de grupos tiólicos de la proteínas (Gallogly and Mieyal, 2007; Townsend, 2007). Además del GSH, otras moléculas ricas en grupos tiólicos parecen estar implicadas en la respuesta al estrés ácido en *Tetrahymena*, como indica el hecho de que la reducción en grupos tiólicos ejercida por la NEM es mayor que la provocada por el BSO. A este respecto, en condiciones de pH ácido se induce drásticamente la expresión de, al menos, un gen de MTs (MTT5) en *T. thermophila* (Díaz *et al.*, 2007), incrementándose así el número total de grupos -SH intracelulares.

2. VALORACIÓN DE GLUTATIÓN TOTAL CELULAR (GSH/GSSG).

Numerosos estudios han demostrado que los metales producen especies reactivas de oxígeno (Pourahmad and O'Brien, 2000; Leonard *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2005; 2006; Franco *et al.*, 2009). Los grupos tiólicos libres, ya sea formando parte de proteínas o en otras moléculas de bajo peso molecular (como el glutatión), se consideran una de las principales defensas frente a la formación de ROS. Mediante el ensayo enzimático utilizado en la valoración de glutatión, se cuantifica el "pool" total de glutatión tanto reducido (GSH) como oxidado (GSSG).

2.1 Determinación de glutatión total celular (GSH/GSSG) a lo largo de la curva de crecimiento.

El estudio de los niveles totales de glutatión celular a lo largo de la curva de crecimiento de una población de *T. thermophila*, muestra (Figura 39, Tabla 12) que el nivel del glutatión total permanece prácticamente invariable durante las fases de latencia y crecimiento acelerado. Durante la fase exponencial (~12 h de duración) el nivel de glutatión se incrementa unas tres veces, alcanzando el máximo cuando termina la fase exponencial. Durante la fase estacionaria, los niveles de glutatión disminuyen unas dos unidades.

Algunos estudios con cultivos de células humanas asocian el incremento de GSH al aumentar la edad de cultivo, con un proceso de diferenciación celular (Atzori *et al.*, 1990). Se ha

comprobado también en cultivos de células animales que se produce un aumento en los niveles de GSH previo a la entrada en la fase S (Shaw and Chou, 1986; Poot *et al.*, 1995). Se sabe que el GSH cede el poder reductor necesario para la actividad de la ribonucleótido reductasa a través de las glutarredoxinas o de las tioredoxinas, y que ésta es una etapa limitante en la síntesis de ADN (Holmgren, 1981). Luego el aumento de GSH en fase exponencial de una población de *T. thermophila*, puede ser consecuencia de la mayor síntesis de ADN por gran parte de las células que conforman la población. La disminución de los niveles de glutatión durante la fase estacionaria se podría deber a cierta mortalidad celular durante esa etapa y/o a la ausencia o escasez de nutrientes en el medio de cultivo. Los metabolitos a partir de los cuales se sintetiza el glutatión, principalmente la metionina (de la que derivará la cisteína) se van agotando de tal forma que no se puede sintetizar glutatión *de novo*, y además debido a los procesos oxidativos que tienen lugar durante el envejecimiento de la población en fase estacionaria, se consume el glutatión preexistente (Eady *et al.*, 1995).

2.2 Determinación de glutatión total celular (GSH/GSSG) bajo el estrés por metales y otros agentes, junto con la utilización de BSO o NEM.

De los experimentos con \pm BSO (presumible inhibidor de la enzima GCL) o \pm NEM (bloqueante de grupos tiólicos) y la valoración del glutatión total (véase resumen en la Tabla 20), podemos concluir lo siguiente:

1) La presencia de Cd^{2+} incrementa los niveles intracelulares de moléculas con grupos $-\text{SH}$, y los niveles totales de glutatión (GSH/GSSG) intracelular.

2) Igualmente, la presencia de As^{5+} parece que incrementa ambos elementos (moléculas con grupos $-\text{SH}$ y glutatión) a tiempos de exposición cortos (2 h), pero a exposiciones prolongadas (24 h) los niveles de ambos parámetros disminuyen. El incremento de glutatión a 2 h de tratamiento con As^{5+} , se correlaciona con la elevada inducción ($\sim 89\text{x}$) del gen que codifica la enzima GCL (involucrada en la biosíntesis de GSH) de *T. thermophila*. El As^{5+} (arseniato) es reducido a As^{3+} (arsenito) y el poder reductor para esta reducción se obtiene del GSH (Del Razo *et al.*, 2001), pasando a su forma oxidada (GSSG) y reduciendo así el número de moléculas reducidas (GSH). Además, varias moléculas de GSH pueden quelar un átomo de As^{5+} (Franco *et al.*, 2009), reduciéndose la cantidad de GSH libre. Y, por último, el GSH puede también actuar como cofactor (fuente de poder reductor) de diversas enzimas que intervienen en reacciones redox para paliar la formación de ROS provocada por el arsénico (Kumagai and Sumi, 2007). Estas, podrían ser las razones de la disminución de ambos parámetros durante un tiempo prolongado de ex-

Tratamiento	Mortalidad		Grupos -SH		Glutación total (GSH+GSSG)	
	↔	Efecto ¹	↔	Efecto ¹	↔	Efecto ¹
Cd ²⁺ -BSO (2 h)	NO	Cd ²⁺ - BSO: (=) Cd ²⁺ + BSO: (=)	Sí	Cd ²⁺ - BSO: ↑ Cd ²⁺ + BSO: ↑(-)	NO	Cd ²⁺ - BSO: (=) Cd ²⁺ + BSO: (=)
Cd ²⁺ -BSO (24 h)	Sí	Cd ²⁺ - BSO: ↑ Cd ²⁺ + BSO: ↑(-)	Sí	Cd ²⁺ - BSO: ↑ Cd ²⁺ + BSO: ↑(-)	Sí	Cd ²⁺ - BSO: ↑ Cd ²⁺ + BSO: ↑(-)
Cd ²⁺ -NEM (2 h)	NO	Cd ²⁺ - NEM: (=) Cd ²⁺ + NEM: ↑	NO	Cd ²⁺ - NEM: (=) Cd ²⁺ + NEM: ↓	Sí	Cd ²⁺ - NEM: ↑ Cd ²⁺ + NEM: ↓
Cd ²⁺ -NEM (24 h)	Sí	Cd ²⁺ - NEM: ↑ Cd ²⁺ + NEM: ↑	Sí	Cd ²⁺ - NEM: ↑ Cd ²⁺ + NEM: ↓	NO	Cd ²⁺ - NEM: ↑ Cd ²⁺ + NEM: ↑
As ⁵⁺ -BSO (2 h)	NO	As ⁵⁺ - BSO: ↑ As ⁵⁺ + BSO: ↑	Sí	As ⁵⁺ - BSO: ↑ As ⁵⁺ + BSO: ↑(-)	Sí	As ⁵⁺ - BSO: (=) As ⁵⁺ + BSO: ↓
As ⁵⁺ -BSO (24 h)	NO	As ⁵⁺ - BSO: ↑ As ⁵⁺ + BSO: ↑	Sí	As ⁵⁺ - BSO: ↓ As ⁵⁺ + BSO: ↓(+)	NO	As ⁵⁺ - BSO: (=) As ⁵⁺ + BSO: (=)
As ⁵⁺ -NEM (2 h)	NO	As ⁵⁺ - NEM: ↑ As ⁵⁺ + NEM: ↑	NO	As ⁵⁺ - NEM: ↑ As ⁵⁺ + NEM: ↑	NO	As ⁵⁺ - NEM: ↑ As ⁵⁺ + NEM: ↑
As ⁵⁺ -NEM (24 h)	NO	As ⁵⁺ - NEM: ↑ As ⁵⁺ + NEM: ↑	Sí	As ⁵⁺ - NEM: ↓ As ⁵⁺ + NEM: ↓(+)	Sí	As ⁵⁺ - NEM: ↓ As ⁵⁺ + NEM: ↓(+)
PQ-BSO (2h)	NO	PQ - BSO : ↑ PQ + BSO : ↑	Sí	PQ - BSO: ↓ PQ + BSO: ↓(+)	Sí	PQ - BSO: ↓ PQ + BSO: ↑
PQ-BSO (24 h)	Sí	PQ - BSO: ↑ PQ + BSO: ↑(-)	Sí	PQ - BSO: ↓ PQ + BSO: (=)	NO	PQ - BSO: (=) PQ + BSO: (=)
PQ-NEM (2 h)	NO	PQ - NEM: ↑ PQ + NEM: ↑	Sí	PQ - NEM: ↓ PQ + NEM: ↓(+)	Sí	PQ - NEM: ↓ PQ + NEM: ↓(+)
PQ-NEM (24 h)	NO	PQ - NEM: ↑ PQ + NEM: ↑	Sí	PQ - NEM: ↓ PQ + NEM: ↓(+)	NO	PQ - NEM: (=) PQ + NEM: (=)
MD-BSO (2 h)	Sí	MD - BSO: ↑ MD + BSO: ↑(-)	Sí	MD - BSO: ↓ MD + BSO: ↓(+)	NO	MD - BSO: ↓ MD + BSO: ↓
MD-NEM (2 h)	NO	MD - NEM: ↑ MD + NEM: ↑	NO	MD - NEM: ↓ MD + NEM: ↓	NO	MD - NEM: ↓ MD + NEM: ↓
pH 5-BSO (24 h)	NO	pH 5 - BSO: (=) pH 5 + BSO: (=)	Sí	pH 5 - BSO: (=) pH 5 + BSO: ↓	NO	pH 5 - BSO: (=) pH 5 + BSO: (=)
pH 5-NEM (24 h)	NO	pH 5 - NEM: (=) pH 5 + NEM: (=)	Sí	pH 5 - NEM: (=) pH 5 + NEM: ↓	NO	pH 5 - NEM: (=) pH 5 + NEM: (=)

(¹): Respecto del control. (=): No cambia significativamente respecto del control. ↑: Incrementa respecto del control. ↓: Disminuye respecto del control. ↑(-): Incrementa menos. ↓(+): Disminuye más. (↔): Interacción. Sí: Interacción positiva.NO: Sin interacción.

Tabla 20. Resumen de resultados mostrados en las figuras 23-38 y 40-47.

posición al arsénico. El gen que codifica la metalotioneína MTT5 de *T. thermophila* se induce con As^{5+} a 24 h de tratamiento con el metal (Díaz *et al.*, 2007), y no a 1 h de tratamiento. No sabemos si esta Cd/Zn-MT puede quelar As^{5+} , si es así el catión tóxico debería disminuir su presencia en el citoplasma, con lo que el GSH podría mantener sus niveles basales o disminuir (dependiendo de la afinidad del As^{5+} por los grupos -SH de la MTT5, respecto de aquellos del GSH). Si no se une a la MTT5, la presencia de un mayor grupo de -SH en el citoplasma debería incrementar el parámetro que mide los grupos -SH a las 24h, cosa que no parece que sea así (Tabla 20).

3) El paraquat (PQ) no parece que incremente los grupos -SH, y disminuye el glutatión total (Tabla 20). En el mecanismo de toxicidad del PQ (producción de radicales superóxido) se ha documentado desde hace tiempo que la enzima superóxido dismutasa interviene como principal defensa frente a este herbicida (Suntres, 2002). Además, diversos estudios han comprobado que el tratamiento con PQ disminuye los niveles de GSH en la célula debido principalmente a la oxidación del NADPH de tal forma que la enzima glutatión reductasa (GR) no puede reducir el GSSG (Nakagawa *et al.*, 1995; Suntres, 2002; Franco *et al.*, 2009; Jos *et al.*, 2009). Igualmente, el PQ (24 h de tratamiento) no induce el gen que codifica la GR de *T. thermophila*, aunque induce (~6x) el que codifica la GCL. El PQ también induce considerablemente (~61x) el gen *TtGSTM9*, lo que podría significar la transferencia de GSH al PQ, con la consiguiente disminución de los niveles de esta molécula.

Nakagawa *et al.*, (1998) trabajando con células de hígado de ratón comprobó como el tratamiento con PQ, previa inhibición de la biosíntesis de GSH con BSO, generaba un incremento en la síntesis de MTs, que no se producía con el solo tratamiento con PQ. Por el contrario, en *T. thermophila* tanto con \pm BSO como \pm NEM los grupos -SH disminuyen en presencia de PQ (2 ó 24 h), a pesar de que el gen *MTT5* de este ciliado se induce (~9x) en presencia de PQ (durante 24 h) (Díaz *et al.*, 2007).

4) La menadiona (MD), que induce principalmente estrés oxidativo, disminuye ambos parámetros (grupos -SH y glutatión total) (Tabla 20). Sin embargo, la MD (tras 2 h de tratamiento) induce espectacularmente (~123x) la expresión del gen de *T. thermophila* que codifica la GCL. Por lo que se podría interpretar que el gasto de GSH es muy superior al producido por la enzima. La MD no induce espectacularmente a los genes codificantes de GSTs analizados de *T. thermophila*, sin embargo sí existe cierta inducción relativa de algunos de ellos, así por ejemplo; *TtGSTM3* (~5x), *TtGSTM46* (~3x), *TtGSTO1* (~4x) y *TtGSTN1* (~4x), por lo que podría actuar alguna GST en la formación de conjugados MD-GSH. Pero lo que más llama la atención es la superexpresión del gen *TtGCL* (~123x) a las 2 h de tratamiento, que es el tiempo en que se detecta la bajada de GSH tanto sin o con BSO o NEM (Tabla 20). La MD podría inhibir la enzima, lo que

a pesar de la sobre-expresión del gen *TtGCL* conduciría a una disminución del GSH. Y este descenso del GSH, induce la expresión de la enzima GCL.

5) El pH ácido (pH 5) no altera sustancialmente los niveles de moléculas con grupos –SH o el glutatión intracelular, aunque se nota el efecto del BSO o NEM (Tabla 20).

El resumen de los datos obtenidos, reflejados en la Tabla 20, nos ha sido muy útil para poder comparar y obtener conclusiones, pero también para detectar algunas incoherencias. Así, por ejemplo; el tratamiento Cd^{2+} + BSO (24 h) produce menos mortalidad que el tratamiento sólo con Cd^{2+} (Tabla 20). Si el BSO inhibe la biosíntesis de GSH, debería incrementar o mantener los mismos niveles de mortalidad que el tratado sólo con Cd^{2+} . Algo similar ocurre con Cd^{2+} + NEM (24 h) y con PQ + BSO (24 h) o MD + BSO (2 h) (Tabla 20). Por lo que parece ser que el BSO y/o NEM no afectan la mortalidad. Otras incongruencias de algunos resultados son; la de As^{5+} + NEM (2 h) respecto a los grupos –SH (Tabla 20), en donde aumenta el nivel de grupos -SH igual que el tratado con sólo As^{5+} . A no ser que el NEM necesite más tiempo para actuar (aunque no parece que sea así en el caso del Cd^{2+} + NEM (2h). Aunque, también se podría interpretar como que la NEM induce la aparición de nuevas moléculas con grupos –SH, manteniendo los niveles inducidos por el As^{5+} .

Por último, con respecto del parámetro glutatión total también surge un posible resultado incongruente; el PQ + BSO (2 h) el cual incrementa el glutatión (Tabla 20), respecto del control y el tratado sólo con PQ (que lo disminuye). Si el BSO actúa efectivamente debería disminuir la producción de GSH, por lo que no se entiende de donde surge el incremento de glutatión.

Descartando estas incongruencias, el resto de los resultados son congruentes y explican la relevancia tanto de GSH como de las moléculas con grupos –SH en la defensa o detoxificación de metales muy tóxicos (Cd^{2+} o As^{5+}) y xenobióticos (PQ o MD) que originan estrés oxidativo.

3. EL GEN DE LA GLUTAMATO CISTEÍNA LIGASA DE *Tetrahymena thermophila* (*TtGCL*).

Como se indicó en la Introducción, la biosíntesis de glutatión en organismos/microorganismos eucariotas comprende dos etapas (ambas dependientes de ATP), catalizadas respectivamente por las enzimas γ -glutamilcisteína ligasa o glutamato cisteína ligasa (GCL, EC 6.3.2.2; previamente llamada γ -glutamilcisteína sintetasa) y glutatión sintetasa (GS). Existen, al menos, cuatro principales razones que corroboran el papel crucial de la GCL en la biosíntesis de GSH.

1) Aunque los estudios son aún escasos, en algunas bacterias Gram-positivas como *Streptococcus agalactiae* la enzima es bifuncional y se encarga de la síntesis completa del tripéptido

GSH. Además, estudios *in silico* indican que un gen similar al de *S. agalactiae* está igualmente presente en ciertas especies de los géneros *Listeria*, *Clostridium*, *Enterococcus* y *Pasteurella* (Janowiak and Griffith, 2005; Vergauwen *et al.*, 2006).

2) Se ha comprobado tanto en plantas como en bacterias, que el dipéptido (glutamil-cisteína) puede sustituir al tripéptido (glutamilcisteinil-glicina o GSH) en condiciones de estrés ambiental (Grant *et al.* 1997; Wu *et al.*, 2009). Sin embargo, tanto cepas *knockout* para el gen *GCL*, como aquellas que presentan bajos niveles de esta enzima (debido a la introducción de ARN de interferencia), o bien las células u organismos expuestos a inhibidores de la *GCL* (como el BSO) son muy sensibles a la presencia de agentes tóxicos u otras condiciones de estrés ambiental, muriendo al poco tiempo (Huynh *et al.*, 2003; Baek *et al.*, 2004; Pasternak *et al.*, 2008; Lu, 2009). Esta hipersensibilidad al estrés por agentes tóxicos se restaura al añadir GSH ó glutamylcisteína al medio.

3) La reacción catalizada por la *GCL* es la etapa limitante de la biosíntesis de GSH, y por lo tanto, determina la proporción de GSH a ser sintetizada. Al menos en mamíferos, esta actividad enzimática está muy regulada. Existen tres niveles posibles de regulación; el nivel transcripcional, en respuesta al estrés oxidativo originado por una gran variedad de agentes, el post-transcripcional (estabilidad del ARNm, fosforilación de la *GCL* y/o ruptura dependiente de caspasa de la *GCL* durante la apoptosis) (Lu, 2009; Franklin *et al.*, 2009), y a nivel fisiológico tanto por retro-inhibición competitiva (no alostérica) por el producto final (GSH), que involucra la unión del GSH a la enzima *GCL*, como por la disponibilidad del precursor L-cisteína (Lu, 2009).

Y 4) Tanto el GSH como el dipéptido γ -glutamylcisteína son precursores de las fitoquelatinas, péptidos implicados en la quelación de metales que se encuentran en todas las plantas estudiadas y, algunas micro-algas, hongos y nemátodos (Clemens *et al.*, 1999, 2001; Vatamaniuk *et al.*, 2001; Clemens, 2006). Se ha comprobado que las plantas y levaduras transgénicas que sobre-expresan el gen de la *GCL* son más resistentes a ciertos metales no esenciales como Cd, As y Hg (Zhu *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2006; Wawrzynska *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2008 b). Estas cuatro razones avalan la importancia capital de esta enzima (*GCL*) en el metabolismo del GSH, que está presente en la mayoría de los seres vivos.

En mamíferos e insectos la *GCL* es heterodimérica; una subunidad catalítica o pesada (*GCL-C*, 73 KDa) y una subunidad ligera o reguladora (*GCL-M*, 30 KDa). La subunidad *GCL-C* presenta la actividad catalítica completa, sin la intervención de la subunidad *GCL-M*, la cual es enzimáticamente inactiva, aunque juega una importante función reguladora de la actividad enzimática, reduciendo la retro-inhibición por el producto final GSH (Forman *et al.*, 2009; Lu,

2009). Por el contrario, en plantas, nemátodos, levaduras, algunos protozoos parásitos y bacterias la enzima GCL es monomérica (Griffith and Mulcahy, 1999; Ashida *et al.*, 2005). El genoma macronuclear de *T. thermophila* contiene un único gen codificante de esta enzima (que hemos denominado *TtGCL*), al igual que sucede en otros microorganismos eucariotas como *Trypanosoma brucei* (Lueder and Phillips, 1996) y *Schizosaccharomyces pombe* (Mutoh *et al.*, 1995). Un análisis del genoma macronuclear del ciliado *Paramecium tetraurelia* nos ha revelado igualmente, la presencia de un sólo gen *GCL*, por lo que podríamos concluir que los ciliados también presentan una *GCL* monomérica. La búsqueda en el genoma macronuclear de *T. thermophila* nos ha revelado la ausencia de un gen codificante de una potencial subunidad reguladora (*GCL-M*). Recientemente (Sharma and Banyal, 2009), se ha caracterizado en el protozoo parásito *Plasmodium berghei* (Apicomplexa) una *GCL* claramente heterodimérica, que presentan un tamaño similar a la de los mamíferos roedores a los que parasita, aunque las secuencias de las subunidades catalíticas procedentes de ambos organismos es muy distinta .

El gen *TtGCL* tiene 1.296 pb de longitud con un intrón de 79 pb, originando una proteína de 405 aa (47,6 KDa). Esta *TtGCL* es considerablemente corta si la comparamos con la mayoría de las *GCLs* de otros organismos eucariotas, incluyendo hongos (661-728 aa), protozoos parásitos (795-1161 aa), invertebrados (601-717 aa) o mamíferos (601-637 aa) (Tabla 21). Igualmente, la posible *GCL* del ciliado *P. tetraurelia* tiene una longitud (678 aa) que está dentro del rango de tamaño promedio de las *GCLs*. Aún es inferior a las *GCLs* de algunas plantas, así por ejemplo; *Arabidopsis thaliana* tiene una *GCL* de 571 aa (May and Leaver, 1994; Jez *et al.*, 2004) y la de *Brassica juncea* es de 514 aa (Schäfer *et al.*, 1998). La *GCL* de otro ciliado (*Ichthyophthirius multifiliis*) (*ImGCL*) tiene una longitud de 583 aa, de tamaño intermedio entre *PtGCL* y *TtGCL*. Hay que señalar que, en los vegetales, esta enzima está localizada exclusivamente en los cloroplastos, mientras que en el resto de los seres vivos es citosólica (Pasternak *et al.* 2008). Por lo tanto, respecto de la longitud de la proteína inferida, la *TtGCL* es única entre los eucariotas, siendo, por otro lado, más similar a aquella de cloroplastos de ciertas plantas como *Oryza sativa* (438 aa), bacterias patógenas como *Mycobacterium tuberculosis* (432 aa) o la más corta de las *GCLs* hasta ahora publicada (379 aa) presente en la cianobacteria *Anabaena* (Ashida *et al.*, 2005).

De acuerdo con el análisis de identidad con otras *GCLs* (Figura 48), la *TtGCL* muestra los porcentajes de identidad más elevados con las *GCLs* de otros protozoos ciliados, tales como *P. tetraurelia* (50 % de identidad) y el ciliado parásito de peces de agua dulce *Ichthyophthirius multifiliis* (65 % de identidad) (Figura 48). Y con respecto a los organismos seleccionados (Figura 48), la *TtGCL* presenta un 48 % de identidad con aquellas *GCLs* del *Homo sapiens*, el ratón (*Mus musculus*) y un 54 % con el pez cebra (*Danio rerio*).

Gen	Organismo	Longitud	Localización celular	Subunidad reguladora	Identificación
SaGCL	<i>Streptococcus agalactiae</i>	750	Citoplasma	No	NP_688811
EcGCL	<i>Escherichia coli</i>	518	Citoplasma	No	NP_417173
AvGCL	<i>Anabaena variabilis</i>	379	Citoplasma	No	YP_323696
ZmGCL	<i>Zea mays</i>	438	Cloroplasto	No	NP_001105142
AtGCL	<i>Arabidopsis thaliana</i>	522	Cloroplasto	No	NP_194041
RnGCL	<i>Rattus norvegicus</i>	637	Citoplasma	Sí	NP_036947
MmGCL	<i>Mus musculus</i>	637	Citoplasma	Sí	NP_034425
HsGCL	<i>Homo sapiens</i>	637	Citoplasma	Sí	NP_001489
DmGCL	<i>Drosophila melanogaster</i>	718	Citoplasma	Sí	NP_525005
CeGCL	<i>Caenorhabditis elegans</i>	654	Citoplasma	*	NP_495927
AfGCL	<i>Aspergillus fumigatus</i>	669	Citoplasma	No	XP_754234
ScGCL	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	678	Citoplasma	No	NP_012434
DdGCL	<i>Dictyostelium discoideum</i>	626	Citoplasma	No	XP_638453
NcGCL	<i>Neurospora crassa</i>	728	Citoplasma	No	XP_961523
SpGCL	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	669	Citoplasma	No	NP_593031
CaGCL	<i>Candida albicans</i>	690	Citoplasma	No	AF176677_1
TbGCL	<i>Trypanosoma brucei</i>	679	Citoplasma	No	XP_823442
PtGCL	<i>Paramecium tetraurelia</i>	678	Citoplasma	No	XP_001439585
TtGCL	<i>Tetrahymena thermophila</i>	405	Citoplasma	No	XP_001019047
MtGCL	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	432	Citoplasma	No	CAA18026

* En *Caenorhabditis* no se ha descrito hasta el momento subunidad reguladora, pero sí en otro nematodo, *Brugia malayi*, en el que se ha localizado en su genoma una posible secuencia codificante para este monómero (Ghedini et al., 2007).

Tabla 21. Características de genes GCLs de diversos organismos.

Las secuencias aminoacídicas de las GCLs se pueden dividir en tres grupos según la similitud de 3 diferentes bloques que se pueden distinguir a lo largo de la secuencia (Copley and Dhillon, 2002); el primer grupo incluye GCLs de γ -proteobacterias (24-93 % de identidad entre ellas), el segundo incluye las de eucariotas (excluyendo a los vegetales) (32-98 % de identidad) y el tercero engloba a GCLs de plantas y α -proteobacterias (45-93 % de identidad). La TtGCL se incluye en el grupo 2 (eucariotas), junto con las de mamíferos, nemátodos hongos, insectos y protozoos parásitos (*Plasmodium*, *Leishmania* y *Trypanosoma*). En la Figura 87, se muestra el alineamiento entre secuencias del tercer bloque comunes al grupo de GCL eucariotas, incluyendo la TtGCL que tiene un promedio de identidad del 59 % entre las restantes del bloque (según los datos de la matriz de identidad obtenida tras usar Clustal W, datos no mostrados).

TtGCL	INV ^D NEKETL ^H FFENIQSTNWN ^S VRLKPP	} Ciliados
PtGCL	DKIHIDDNTAHFEATQSSNWN ^S VRFKPP	
ImGCL	IEQDN ^S SKSTSHFESIQTSTNWN ^S VR ^I KPP	
CaGCL	INQDNNLENDHFFENIQSTN ^W QTLRFKPP	
HsGCLC	IHL ^D DANESD ^H FFENIQSTN ^W QTM ^R FKPP	
PbGCL	YKEKVL ^S SHQ ^H FFENFQSTNWN ^S VR ^F KPP	
ScGCL	LNQDNKT ^S SNHFFENIQSTN ^W QTLRFKPP	
SpGCL	ILQDN ^S SV ^S NAHFFENLN ^S TN ^W QSM ^R FKPP	
TcGCL	IDIDDTTHTEHFFENIQSTN ^W QSVRLKPP	
CeGCL	IEQDDEK ^S SEHFE ^T IQSS ^N WMNMRFKPP	

Figura 87. Alineamiento del tercer bloque de similitud (28 aa) dentro del grupo de las GCL eucariotas (excluyendo a los vegetales) (Copley and Dhillon, 2002). TtGCL (*Tetrahymena thermophila*), PtGCL (*Paramecium tetraurelia*), ImGCL (*Ichthyophthirius multifiliis*), CaGCL (*Candida albicans*), HsGCLC (*Homo sapiens*), PbGCL (*Plasmodium berghei*), ScGCL (*Saccharomyces cerevisiae*), SpGCL (*Schizosaccharomyces pombe*), TcGCL (*Trypanosoma cruzi*), CeGCL (*Caenorhabditis elegans*). Aminoácidos idénticos mayoritarios se muestran sombreados en amarillo.

3.1 Sobre el origen de la TtGCL.

Según Copley and Dhillon (2002), y de acuerdo con la distribución de los genes *GCLs* en el árbol filogenético basado en el ARNr, dos posibles escenarios se podrían haber producido a lo largo de la evolución:

- 1) el gen *GCL* se podría haber originado temprano tanto en la línea procariota como eucariota y experimentar transferencia lateral de uno a otro dominio, y
- 2) el gen *GCL* podría estar presente en el ancestro común universal y haberse perdido tempranamente en arqueas, en el origen de la rama eucariota y en muchas bacterias.

Esta segunda posibilidad requiere que el gen *GCL* (el cual parece ser importante sólo en organismos aerobios), debe haberse originado en el último ancestro común antes de la aparición del oxígeno, lo que ocurrió sólo después de la evolución de las cianobacterias hace ~2.600 millones de años (Copley and Dhillon, 2002). La posibilidad de que el gen *GCL* surja tempranamente en la línea bacteriana y luego se transfiera a la línea eucariota y a alguna arquea (*Halobacterium*), parece más plausible. Según los mismos autores (Copley and Dhillon, 2002), la primera *GCL* pudo haber surgido en cianobacterias junto con la capacidad de fotosíntesis oxigénica, pudiendo haber sido una de las primeras protecciones contra especies reactivas de oxígeno (ROS). Posteriormente, en las proteobacterias que desarrollaron un metabolismo aerobio y la consecuente producción de ROS podría haber dado una ventaja selectiva en aquellos microorganismos con *GCL* obtenida por transferencia lateral a partir de las cianobacterias. Igualmente, podría haber sido una ventaja selectiva para eucariotas aerobios adquirir y retener la *GCL* bacteriana. La transferencia del gen *GCL* desde una α -proteobacteria progenitora de mitocondrias,

es un posible mecanismo para la dispersión de GCL entre los eucariotas. Sin embargo, no se ha mostrado una asociación significativa entre las secuencias GCL de α -proteobacterias y eucariotas. Doolittle (1998), propuso otro posible mecanismo de transferencia lateral entre dominios, basado en que protistas que usan bacterias como alimento pueden incorporar genes bacterianos en sus genomas eucariotas. La transferencia lateral de genes a eucariotas no fotosintéticos desde α -proteobacterias (progenitoras de mitocondrias) y/o a eucariotas fotosintéticos (algas, plantas) desde cianobacterias (progenitoras de cloroplastos) está bien documentada y admitida. Los resultados obtenidos por Copley and Dhillon (2002) muestran una clara evidencia de transferencia de genes GCLs entre α -proteobacteria y plantas (y posiblemente algas).

Según el árbol filogenético inferido de las secuencias aminoacídicas de GCLs de organismos representantes de los tres grupos (Copley and Dhillon, 2002) y que se muestra en la Figura 88, quedan definidos estos tres grupos; el grupo-1 (principalmente γ -proteobacterias), el grupo-2 (eucariotas, excepto plantas) y el grupo-3 (principalmente α -proteobacterias, plantas y posiblemente algas). Como un grupo separado están las GCLs de cianobacterias (Figura 88). La GCL del género *Halobacterium sp.* inicialmente introducido en el grupo-3 (Copley and Dhillon, 2002) aparece más cercana y en la raíz de las GCLs del grupo-1 (γ -proteobacterias). Además, las GCLs del grupo-2 (eucariotas) están bien delimitadas en dos subgrupos que comprende las GCLs de protistas y las del resto de los eucariotas (excepto plantas y algas). Las GCLs de protistas (incluyendo la TtGCL) parece tener como ancestro la GCL de *Trypanosoma* (kinetoplástido), que a su vez pudo estar relacionada con las GCLs de cianobacterias. Las tres GCLs de ciliados (TtGCL, PtGCL y ImGCL) están conectadas con PbGCL (*Plasmodium berghei*) (Apicomplexa), lo que coincide con la filogenia basada en otras proteínas (actina, α y β -tubulinas) (Baldauf, 2003). De hecho, podríamos especular sobre la historia evolutiva de las GCLs aplicando el siguiente modelo. Una GCL primigenia monomérica y de pequeño tamaño pudo haber surgido en las cianobacterias (los primeros organismos fotosintéticos aerobios). Aplicando la teoría de la endosimbiosis seriada (o Simbiogénesis) (Sogin, 1991), está ampliamente admitido que las cianobacterias pudieron dar lugar a los cloroplastos en un proceso de endosimbiosis secundaria con un primer eucariota aerobio termoacidófilo o metacariota, originando las algas Rhodofitas. Estas en una endosimbiosis terciaria con un flagelado heterótrofo (Euglénidos) originarían dinoflagelados autótrofos (Cryptomonádidos), los cuales podrían haber originado, mediante otra endosimbiosis terciaria con un antecesor flagelado heterótrofo, a los ciliados. Por lo tanto, la GCL de *Tetrahymena* pudo haber tenido como ancestro a la GCL de cianobacteria, que pasó desde el genoma del cloroplasto del dinoflagelado autótrofo al macronúcleo del ciliado. Igualmente, desde un punto de vista taxonómico, los ciliados (Ciliophora) se incluyen dentro

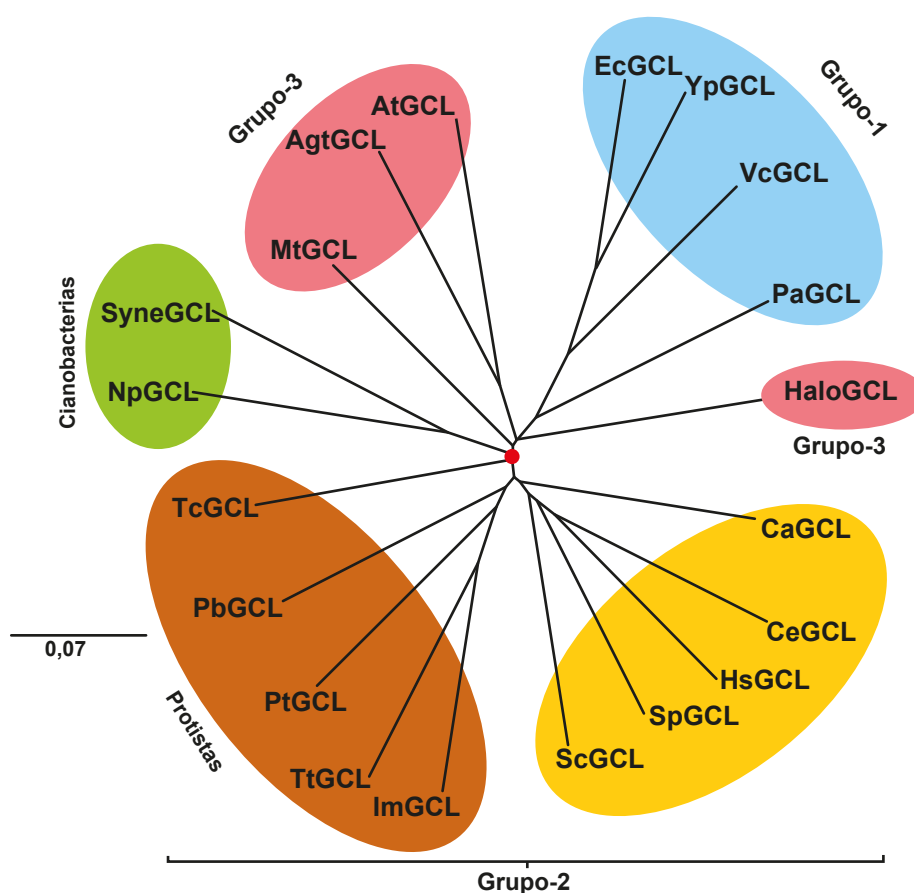


Figura 88. Árbol filogenético de secuencias aminoacídicas GCL de organismos seleccionados de los tres grupos (Copley & Dhillon., 2002), previamente alineadas por el método T-Coffee. AgtGCL: *Agrobacterium tumefaciens*, AtGCL: *Arabidopsis thaliana*, CaGCL: *Candida albicans*, CeGCL: *Caenorhabditis elegans*, EcGCL: *Escherichia coli*, HaloGCL: *Halobacterium sp.*, HsGCL: *Homo sapiens*, ImGCL: *Ichthyophthirius multifiliis*, MtGCL: *Mycobacterium tuberculosis*, NpGCL: *Nostoc punctiforme*, PaGCL: *Pseudomonas aeruginosa*, PbGCL: *Plasmodium berghei*, PtGCL: *Paramecium tetraurelia*, ScGCL: *Saccharomyces cerevisiae*, SpGCL: *Schizosaccharomyces pombe*, SyneGCL: *Synechococcus sp.*, TcGCL: *Trypanosoma cruzi*, TtGCL: *Tetrahymena thermophila*, VcGCL: *Vibrio cholerae*, YpGCL: *Yersinia pestis*. La barra indica el número de sustituciones/sitio.

de los Alveolata (alveolados) (Cavalier-Smith, 1991) que igualmente incluyen a los Apicomplexa (en donde se encuentra *Plasmodium*) y los Dinoflagelados. El grupo Alveolata tiene un ancestro común con los Excavata (según filogenia eucariota basada en proteínas tales como; actina, α y β tubulinas) (Baldauf, 2003), que incluye a los Euglenozoa (en donde se encuentra *Trypanosoma*), estas relaciones están igualmente bien reflejadas en el árbol de la Figura 88. En un dinoflagelado no-fotosintético (*Cryptocodinium cohnii*) (Sánchez-Puerta et al., 2007) se han identificado genes de origen plastídico, y el análisis filogenético de algunos de ellos sugiere que estos genes puedan haberse originado de un endosimbionte fotosintético (cianobacteria o alga), teniendo en cuenta el origen temprano de los dinoflagelados fotosintéticos de los que se derivaron los dinoflagelados heterótrofos. Durante la integración del endosimbionte

en la célula hospedadora hubo transferencia de genes desde el genoma del endosimbionte (plástido) al núcleo del hospedador (eucariota heterótrofo). En el núcleo de muchos eucariotas fotosintéticos se han encontrado numerosos genes plastídicos. De esta lista de genes de origen plastídico (Sánchez-Puerta *et al.*, 2007), podemos destacar dos relacionados con el metabolismo del glutatión (la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa), a la cual también podríamos incorporar la GCL (enzima fundamental de la biosíntesis del GSH), filogenéticamente previa a las dos anteriormente citadas. La hipótesis cromoaalveolata (Cavalier-Smith, 1999) (el super-grupo de los Cromoaalveolados constituyen una de las principales líneas eucariotas, que incluyen a los Alveolados) implica una adquisición única de plástidos para todos los cromoaalveolados, lo que podría indicar que las líneas no fotosintéticas alguna vez tuvieron plástidos y, por lo tanto, se espera que genes derivados de plástidos existan en sus genomas nucleares.

3.2 Expresión del gen *TtGCL*.

Los resultados del análisis de expresión (RT-PCR cuantitativo) muestran que este gen (*TtGCL*) del ciliado *T. thermophila* se expresa de forma significativa, y principalmente frente a agentes que inducen estrés oxidativo. Esto coincide con lo previamente conocido sobre la GCL en otros organismos; el estrés oxidativo causado por diversos agentes se encuentra asociado a un incremento de los niveles intracelulares de GSH, un incremento en la actividad enzimática de la GCL y un incremento de los niveles del correspondiente ARNm o los niveles de transcripción (Shelly and Lu, 2009).

Agentes químicos oxidantes y electrófilos (PQ, MD y CDNB) inducen significativamente la expresión de este gen (Figura 49). Uno de los compuestos que más inducen la expresión del gen *TtGCL* (un promedio de 123 veces los niveles basales) es la MD, compuesto que induce la formación de ROS (tales como superóxido, peróxido y radicales hidroxilo) (Chung *et al.*, 1999). La MD como inductor de la expresión de genes *GCL* ha sido previamente descrito (Rahman *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2004; Maher, 2005; Franklin *et al.*, 2009). El xenobiótico CDNB induce unas 13 veces la expresión basal del gen *TtGCL*, e igualmente es un compuesto que induce estrés oxidativo. Por último, el herbicida PQ (ampliamente utilizado en ambientes acuáticos y terrestres, aunque es tóxico para los animales y el hombre) tiene la capacidad de generar aniones superóxidos que conduce a la formación de H_2O_2 y radicales hidroxilo, y también induce la expresión del gen *TtGCL* (unas 6 veces, después de un tratamiento de 24 h). En levaduras (Valko *et al.*, 2006), también se ha descrito un efecto similar del PQ sobre el gen *GCL* de este microorganismo. Otro herbicida similar, denominado Diquat (DQ), también se ha descrito como inductor de la expresión de genes *GCL* (Maher, 2005). El H_2O_2 también induce la expresión de este gen

(Franklin *et al.*, 2009; Maher, 2005). Tanto la actividad de la enzima GCL como la expresión del gen se incrementan por la exposición a 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), el cual es un aldehído α , β -insaturado que se origina por la reacción de ROS de los ácidos grasos poli-insaturados, por lo que constituye uno de los principales productos finales de la peroxidación lipídica, afectando a las propiedades de las membranas y la función de complejos asociados a membrana (Iles and Liu, 2005). Igualmente, el HNE afecta a la expresión de genes, con la particular habilidad de inducir la expresión de muchos genes de la fase-II (toxicológica), incluyendo el gen *GCL* (Iles and Liu, 2005). En general, los oxidantes consumen GSH, disminuyendo sus niveles intracelulares, por lo que para mantener los niveles basales de GSH se induce la biosíntesis *de novo* de GSH, y para ello se incrementan los niveles de inducción del gen *GCL*.

El pH 5 incrementa de manera similar a la MD (unas 120 veces) la expresión del gen *TtGCL* (Figura 49). La función del GSH en un estrés ácido es poco conocida, sin embargo se ha mostrado que en bacterias el GSH protege a la célula contra un estrés ácido (Ricciolo *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007). El pH óptimo de la GCL es ligeramente básico; 8,2 en *Drosophila* (Toroser *et al.*, 2006). Cuando el valor de pH disminuye la eficiencia de la enzima disminuye igualmente, de tal forma que la misma cantidad de enzima genera menos cantidad de GSH, lo que provocaría una inducción en la expresión del gen *GCL* para así mantener los niveles intracelulares de GSH. Esta es la primera vez que se muestra en un microorganismo eucariota la inducción de la expresión del gen *GCL* por un pH ácido. Por el contrario, el pH básico no produce efecto significativo alguno sobre los niveles de expresión del gen *TtGCL*, al igual que la inanición (Figura 49).

Con respecto al estrés inducido por metales y su efecto sobre la expresión del gen *TtGCL*, podemos resumirlo en los siguientes puntos;

1) en general, la inducción transcripcional del gen *TtGCL* es superior en exposiciones metálicas cortas (2 h) frente a tratamientos prolongados (24 h) para el mismo metal, lo cual tiene sentido en tanto que la célula responde rápidamente (primera barrera de defensa) a la toxicidad originada por la presencia del metal, decaendo la respuesta a lo largo del tiempo debido a que la toxicidad del metal ha sido minimizada por las metalotioneínas (Díaz *et al.*, 2007) o el propio GSH.

2) como se podría esperar, es el arsénico (ión arseniato, As^{5+}) entre los metales ensayados, el que origina los mayores niveles de expresión del gen *TtGCL* (89 veces el nivel basal) (Figura 49). El resto de los metales (excepto el Cu^{2+}), tras 2 h de exposición, presentan valores de inducción muy similares (7 veces el valor basal).

Se ha comprobado que metales y compuestos electrófilos inducen la expresión del gen *GCL* en otros organismos como anélidos (Sandrini *et al.*, 2006) y en plantas (Maher, 2005; Rueggsegger *et al.*, 1990; Schäfer *et al.*, 1998), al igual que en microorganismos como cianobacterias y levaduras (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005).

Muchos estudios han confirmado la generación de radicales libres por arsénico, siendo este un proceso complejo que incluye la formación de superóxidos, oxígeno-singlete, peróxidos, óxido nítrico, H_2O_2 , peróxido dimetil-arsénico y radicales dimetil-arsénico (Valko *et al.*, 2006). En animales no se ha demostrado la posibilidad de que las metalotioneínas (MTs) puedan quelar arsénico, aunque existen algunas evidencias que indican que ciertas metalotioneínas de mamíferos pueden quelar, al menos *in vitro* iones (As^{3+}) de este metaloide (Ngu *et al.*, 2010a; 2010b). En *T. thermophila* (Díaz *et al.*, 2007), la expresión del gen *MTT5* (codificante de una Cd-metalotioneína) es inducida por arsénico, e igualmente, la expresión del gen *MTT1* (otra CdMT) de *T. rostrata* también es inducida por arsénico (Amaro *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2011). Por otro lado, la disminución de los niveles de GSH por BSO hace que las células sean más sensibles a arsenito y arseniato (Kumagai and Sumi, 2007). En animales, se ha descrito una nueva ruta de detoxificación de arsénico inorgánico que involucra la conjugación con GSH de As^{3+} para formar tri-glutatión arsenito y subsiguiente metilación originando monometil-arsénico y glutatión dimetil-arsénico (Shimizu *et al.*, 1998). La enzima que cataliza la metilación requiere agentes reductores como el GSH y la cisteína, lo que explica la necesidad de incrementar la biosíntesis de GSH.

En plantas (Li *et al.*, 2005), en las que tanto las metalotioneínas como las fitoquelatinas están involucradas en la resistencia frente al arsénico, tres principales funciones se ha atribuido al GSH en relación con el estrés por arsénico;

- 1) Participa en la reducción del arsenato a arsenito ,
- 2) Constituye el sustrato de la biosíntesis de fitoquelatinas y
- 3) Es una molécula queladora de arsenito (Li *et al.*, 2005).

Los resultados del análisis de la expresión del gen *TtGCL* nos indican que el GSH es un elemento importante en la defensa contra el estrés oxidativo y la presencia de arseniato en el medio. Aunque realizados en condiciones diferentes, si comparamos estos resultados con aquellos obtenidos relativos a la cantidad de GSH en presencia de metales (principalmente arseniato, tratamiento de 2 h) (Figura 42A), vemos que los niveles de GSH se mantienen similares a los controles (entre 3-4 nmoles/ 10^6 células) a pesar del incremento en la concentración del metal, lo cual se podría interpretar como la presencia de una mayor cantidad de enzima GCL (que correspondería a una mayor expresión del gen) para mantener equilibrados dichos niveles intracelulares. Si inhibimos su biosíntesis (tratamientos con BSO), a pesar de los niveles

incrementados de enzima (inducción de la expresión), se afecta negativa y significativamente los niveles de GSH intracelular. En tratamientos prolongados (24 h), los niveles de GSH ya se han equilibrado e igualado con los controles.

Miao y colaboradores (Miao *et al.*, 2009) han desarrollado una micromatriz (*microarray*) del genoma-macronuclear de *T. thermophila*, y han analizado la expresión de diversos genes (incluyendo el gen *TtGCL*) en diferentes condiciones (durante el ciclo crecimiento-división, el proceso de conjugación y durante inanición). Los resultados obtenidos para el gen *TtGCL* se muestran en la Figura 89. El gráfico de la Figura 89A muestra que a medida que avanza el crecimiento de la población se incrementan los niveles de expresión del gen *TtGCL*, indicando la necesidad de mayores requerimientos de GSH, principalmente en fase exponencial. Esto estaría de acuerdo con nuestros resultados sobre los niveles de GSH durante la curva de crecimiento (Figura 39), en donde se aprecia un incremento significativo de los niveles de GSH en la segunda mitad de la fase exponencial y su conexión con la fase estacionaria, en donde los niveles van disminuyendo. Durante la inanición (Figura 89B), aunque existe un aparente incremento de la expresión del gen *TtGCL* a las 2 h, si observamos el eje de las unidades arbitrarias (UA) los valores máximos alcanzados, que se mantienen durante 24 h, no sobrepasan a aquellos existentes para este gen durante el crecimiento (Figura 89A). Por el contrario, durante la conjugación (que se induce y desarrolla en inanición) (Figura 89C), los niveles de expresión de la *TtGCL* decaen hasta valores (unidades arbitrarias) similares a aquellos presentados durante la inanición (6.000-8.000 ua), con un incremento discreto localizado a las 4 h de iniciada la conjugación (aproximadamente en la fase de intercambio de pronúcleos).

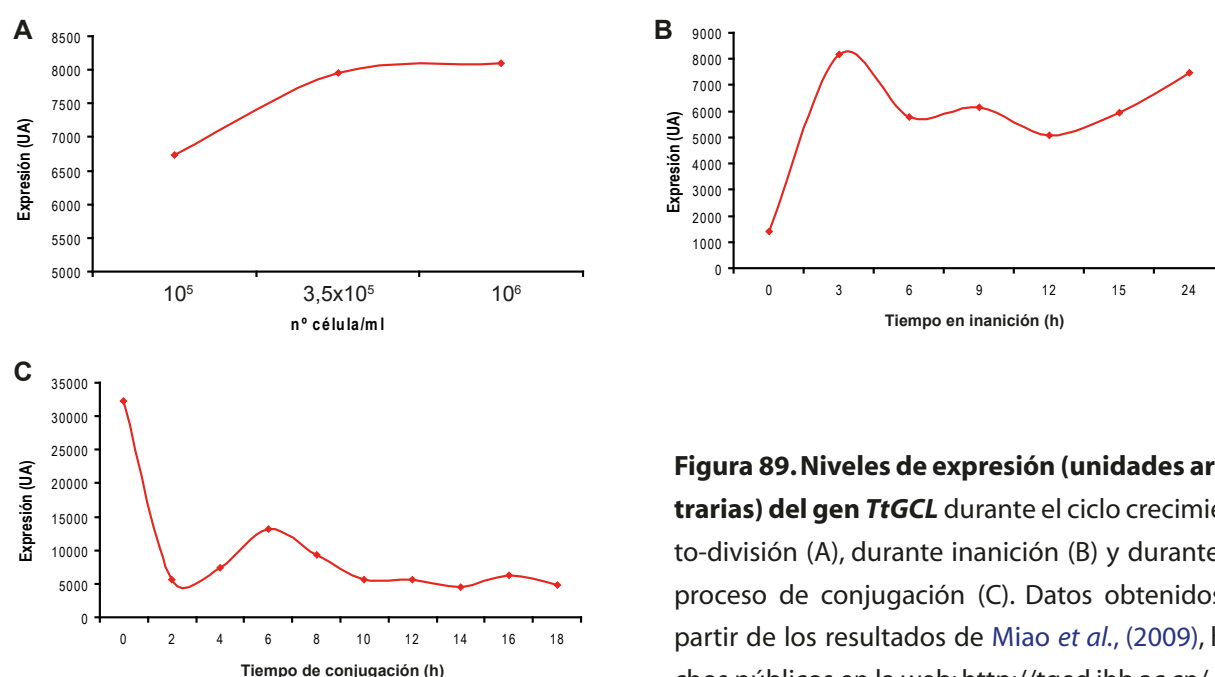


Figura 89. Niveles de expresión (unidades arbitrarias) del gen *TtGCL* durante el ciclo crecimiento-división (A), durante inanición (B) y durante el proceso de conjugación (C). Datos obtenidos a partir de los resultados de Miao *et al.*, (2009), hechos públicos en la web: <http://tged.ihb.ac.cn/>.

4. LA FAMILIA DE GSTs DE *T. thermophila*.

Las GSTs (glutación transferasas; EC 2.5.1.18) constituyen una superfamilia de proteínas multifuncionales. Se reconocen cuatro principales subfamilias o grupos, cada una de las cuales está constituida por familias multigénicas; las GSTs citosólicas o solubles ("canónicas") se han descrito en muchos organismos aerobios (e inicialmente fueron descubiertas en mamíferos) (Hayes *et al.*, 2005), las GSTs microsomales, denominadas MAPEG (*Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism*) y que están asociadas a membrana, las GSTs codificadas por plásmidos bacterianos y resistentes a fosfomicina (Frova, 2006) y las GSTs de la clase Kappa (localizadas en mitocondrias y peroxisomas) (Zimniak and Singh, 2007). Las GSTs citosólicas se han clasificado en diferentes clases, en base a ciertos criterios, tales como; identidad/homología de las secuencias aminoacídicas/nucleotídicas, la estructura del gen (presencia/ausencia de intrones), estructura 3D y propiedades de inmunoreactividad. Algunas de estas clases son ubicuas (aún entre los diferentes reinos), mientras otras son específicas de grupo-taxonómico o especie. Actualmente, en mamíferos se reconocen 7 clases de GSTs citosólicas; las específicas de mamíferos (Alpha, Mu y Pi) y las comunes con otros grupos; Sigma, Theta, Zeta y Omega (Frova, 2006). Otras clases de GSTs específicas de grupo son; la clase Beta específica de algunos grupos procariotas (proteobacterias, cianobacterias), la Delta y Epsilon específica de insectos, y las Phi y Tau específicas de plantas (Frova, 2006; Sheehan *et al.*, 2001) (Tabla 22). En *Tetrahymena thermophila*, tras explorar su genoma macronuclear completamente secuenciado (www.ciliate.org), hemos localizado 63 genes que codifican presumiblemente para GSTs citosólicas que por su similitud con la secuencia aminoacídica de otros organismos se pueden agrupar en 4 clases: 47 de clase Mu, 7 de clase Omega, 5 de clase Theta, 2 de clase Zeta y 2 no asignadas a ninguna de las clases previamente conocidas (por falta de identidad con ellas). En la Tabla 22 se muestra un análisis comparativo del número de isoformas de GSTs repartidas en las diferentes clases, presentes en organismos de muy diferente localización taxonómica. En la columna correspondiente a presumibles GSTs de ciliados, se muestran las detectadas en los genomas-macronucleares secuenciados de *T. thermophila* y *Paramecium tetraurelia*. En ambos casos (Tabla 22), el número mayoritario de GSTs corresponde a la clase Mu (con 47 y 8 isoformas, respectivamente), las cuales son específicas de mamíferos. Igualmente, los gusanos, como *Caenorhabditis elegans*, presentan GSTs relacionadas con las clases Sigma, Mu y Pi, las dos últimas (específicas de vertebrados). La detección de GSTs específicas de mamíferos (Alpha, Mu o Pi) en organismos muy diferentes (gusanos o ciliados) es algo raro o inusual, y por lo tanto destacable. También, ambos ciliados presentan isoformas de las clases Theta, Omega y Zeta, que son GSTs

Clase GST	Mamíferos		Insectos	Plantas		Protozoos ciliados			Bacterias		
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oriza sativa</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	<i>Paramecium tetraurelia</i>		<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Theta	2	3	4	3	2	5	5				
Omega	2	2	4			7	7				
Zeta	1	1	2		3	2	5				
Sigma	1	1	1								
Alpha	6	6									
Mu	5	6				47	8				
Pi	1	2									
Tau				28	39						
Phi				13	16		2				
Lambda				2	1						
Delta			10								
Epsilon			10				2				
Beta									5	1	16
Sin clasificar						2	2				
TOTAL	18	21	31	46	61	63	31	5	1	16	

Tabla 22. Número de isoformas de GSTs asignadas a diferentes clases presentes en diferentes organismos (incluyendo ciliados). En color amarillo se destacan las clases específicas de un grupo-taxonómico de organismos.

citosólicas comunes entre mamíferos y otros organismos (plantas, insectos) (Tabla 22). Además, *P. tetraurelia* muestra 2 isoformas de GSTs relacionadas con las clases Phi y Epsilon, específicas de plantas e insectos, respectivamente. Llama la atención el elevado número de isoformas de GSTs presentes en los ciliados, al igual que en plantas (Tabla 22).

El conocimiento sobre GSTs de protozoos es, actualmente, muy escaso. En el protozoo parásito productor de la malaria *Plasmodium falciparum* se aisló y caracterizó una GSTs (PfGST) que no se clasifica dentro de ninguna clase conocida, por la que se considera específica de especie (Fritz-Wolf *et al.*, 2003; Hiller *et al.*, 2006). Igualmente, en el protozoo ciliado *Blepharisma japonicum* se han caracterizado dos isoformas de GSTs (86% de identidad), inducibles por luz, (Takada *et al.*, 2004; Takada and Matsuoka, 2008), no clasificables en ninguna clase conocida, aunque relacionadas con las clases Mu, Alpha, Pi (específicas de vertebrados) y Sigma. Tanto *T. thermophila* como *P. tetraurelia* tienen además dos isoformas no clasificables (Tabla 22), que podrían ser consideradas como específicas de especie.

4.1 Análisis comparativo de las características estructurales.

Los genes GSTs clase Mu de *T. thermophila* (47 isoformas, genes *TtGSTM1-TtGSTM47*) (Tabla 13) presentan una homología entre ellos que oscila entre muy alta ($\geq 90\%$) o alta ($\geq 80\%$) y sólo 4 genes (*TtGSTM1*, *TtGSTM8*, *TtGSTM17* y *TtGSTM45*) tienen homologías con el resto inferiores a un 65 %. Esta es la razón de que sea difícil diseñar cebadores específicos que diferencien unos genes de otros, para el estudio de su expresión por RT-PCR cuantitativo. Un caso extremo lo muestran los genes *TtGSTM28* y *TtGSTM29* con un 100% de homología entre ellos (Figura 54). El gran número de isogenes *GSTM* y su elevada homología nucleotídica da pie a pensar en un posible origen basado en extensivas duplicaciones, como probablemente ha ocurrido con otras familias génicas en el genoma macronuclear de *T. thermophila* (Eisen *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2009). Entre los genes GSTs incluidos en la clase Omega (7 genes) presentan homologías $< 65\%$, excepto para los genes *TtGSTO3* y *TtGSTO4* que tienen una homología del 96 %. Las cinco secuencias incluidas en la clase Theta tienen una homología $\geq 70\%$ a excepción del gen *TtGSTT5*.

Con respecto a la identidad de las secuencias aminoacídicas inferidas, los porcentajes de identidad en todos los casos son superiores a los porcentajes de homología, debido a que cambios en la secuencia nucleotídica no siempre implican cambios en la secuencia aminoacídica. Un análisis comparativo entre las identidades de las secuencias aminoacídicas de las GSTs de ambos ciliados *T. thermophila* y *P. tetraurelia*, nos revela que:

1) Dentro de las 4 clases comunes para ambos ciliados (Mu, Omega, Theta y Zeta) (Tabla 22) los niveles de identidad de las secuencias GST están comprendidos en rangos (%) que, en general, tienen valores mayores en *Tetrahymena* que en *Paramecium*, por ejemplo; los rangos de % de identidad para las de clase Omega son de 97-88 % en *Tetrahymena* y 93-60 % en *Paramecium*, las de clase Theta tienen unos valores de identidad comprendidos entre 95-79 % en *Tetrahymena* y 92-62 % en *Paramecium*, y las de clase Mu tienen unos rangos de 100-31 % para *Tetrahymena* y 95-52 % para *Paramecium*, y

2) La comparación entre las GSTs de ambos ciliados correspondientes a la misma clase, muestra los siguientes rangos de % de identidad; clase Mu (32-1 %), Theta (60-43 %), Zeta (50-35 %), Omega (43-30 %), por lo que las clases Theta y Zeta son las más similares entre ambos ciliados.

A diferencia de otras GSTs (como las humanas) la mayoría de los genes GST de *T. thermophila* no presentan intrones. Dentro de la clase Mu, un 79 % de ellos no presentan intrones, un 80 % de la clase Theta y el 100 % de los clasificados como "N" (específicos de especie), sin embargo los clasificados en otras clases, como Omega o Zeta, la mayoría (100 % en la clase Zeta y 86 % los de la clase Omega) presenta intrones, como ocurre en los 18 genes de GST humanos que todos ellos tienen intrones (4-8 intrones) (Jowsey and Hayes, 2006). El número mayoritario de intrones en los genes GSTs de *T. thermophila* es de 1 ó 2. Sin embargo en los genes más grandes (> 1.000 pb) suele aparecer un mayor número de intrones (3 en *TtGSTM3* con 2.482 pb, 4 en *TtGSTM45* con 2.881 pb ó 7 en *TtGSTM1* con 6.050 pb) (Tabla 13). A diferencia de lo que ocurre en *T. thermophila*, el número de intrones dentro de los genes de la misma clase de GST se suele mantener constante, al menos en los genes GSTs de humanos (Jowsey and Hayes, 2006). En *Paramecium tetraurelia*, y al contrario de lo que ocurre en *T. thermophila*, todos los 31 genes codificantes de presumibles GSTs de las 7 clases que presenta este ciliado (Tabla 22) tienen intrones, por lo que se asemeja más a lo que ocurre en humanos. El número de intrones de los genes GSTs de *P. tetraurelia* varía de 1 a 6 (con un promedio de 2 por gen). En *B. japonicum* las dos GSTs identificadas carecen de intrones (Takada and Matsuoka, 2008), y en *P. falciparum* la mayor parte del gen es no codificante (Liebau et al., 2002).

En animales vertebrados e insectos, se ha comprobado que se produce un procesamiento postranscripcional diferencial ("splicing alternativo"), de tal forma que un único gen pueda dar lugar a varias proteínas en función de la combinación de exones que se produzca (Ranson et al., 1998; Wongsantichon and Kettermann, 2005). El dominio I (tipo tiorredoxina) de las GSTs, donde se localizan los principales residuos implicados en la unión con el GSH, está más conservado y es semejante en todas las clases. Por el contrario, el dominio II o C-terminal, donde

radican los aminoácidos que reconocen los sustratos, es más variable, de tal forma que la variabilidad generada en este segundo dominio provoca que las diversas GSTs puedan reconocer múltiples sustratos. Así, la combinación diferencial de exones producirá proteínas que reconozcan distintos sustratos a partir de un mismo gen. La ausencia de intrones en una gran mayoría de los genes de *T. thermophila* impide que se produzca el proceso de “*splicing* alternativo” por lo que podría ser una explicación del elevado número de isogenes presentes en este organismo, con suficiente variabilidad entre las GSTs, para responder a los diferentes sustratos.

En cuanto a la localización y organización cromosomal de los diferentes genes de GST en *T. thermophila*, podemos indicar que estos se localizan agrupados en el mismo cromosoma o brazo cromosómico o en distintos cromosomas. *T. thermophila* tiene 4 pares de cromosomas metacéntricos (numerados del 1 al 4) y uno telocéntrico (identificado con el número 5), y en todos ellos hay algún gen GST (Figura 50). La mayoría (17 genes) están localizados en el cromosoma 4 (principalmente en el brazo izquierdo o 4L), el segundo lugar lo ocupa el cromosoma 5 con 8 genes (todos de la clase Mu), junto con el cromosoma 1 (con otros 8 genes de las clases Mu y Theta). Y los cromosomas más pobres en genes GSTs son el 2 y 3, con 3 y 2 genes GSTs, respectivamente. En humanos, los 18 genes GSTs están repartidos en 8 cromosomas; 5 (todos de clase Alpha) en el cromosoma 6, otros 5 (todos de la clase Mu) en el cromosoma 1 (son los que tienen más genes GSTs), luego el cromosoma 10 y el 22 poseen 2 genes GSTs cada uno (clases Omega y Theta, respectivamente) y el resto está repartido (1 por cromosoma) en los cromosomas 4, 7, 11 y 14 (Morel et al., 2002, Jowsey and Hayes, 2006). Entre los seres vivos estudiados, existe cierta tendencia a agrupar genes GSTs de la misma clase en un mismo agrupamiento (“clusters”) en un cromosoma o región cromosómica. Lo cual nos ratifica el origen de estos genes por duplicación y posterior diversificación a lo largo de la historia evolutiva de esta familia génica.

En el ciliado *B. japonicum* (Takada and Matsuoka, 2008), ambos genes GSTs están localizados “en tándem” en la misma región cromosómica. En insectos, muchos genes GSTs están también agrupados en “clusters” (Toung et al., 1993), por ejemplo; genes GSTs de la clase Delta y Epsilon de *Drosophila melanogaster* están agrupados en el mismo cromosoma. En el gusano de seda (*Bombyx mori*) 21 de los 23 genes GSTs están distribuidos en 12 cromosomas; genes GSTD (clase Delta) están agrupados en el cromosoma 6, la mayoría de los genes GSTO (clase Omega) se localizan en el cromosoma 11 y tres de clase Epsilon están “en tándem” en el cromosoma 7 (Yu et al., 2008). Otro caso igualmente representativo de esta agrupación en “cluster” se da en plantas. Por ejemplo, de los 46 genes GSTs de *Arabidopsis thaliana*, 7 genes de clase Tau aparecen agrupados en “tándem” en una región cromosómica de 14 Kb (Lin et al., 1999). Incluso en bacterias, los genes GSTs se agrupan en operones involucrados en ciertos procesos degradativos (Vuilleumier and Pagni, 2002).

Si definimos una agrupación o “cluster” como a aquellos genes de función similar separados entre ellos por una distancia $\leq 2\text{Kb}$. Según esta definición, de los 47 genes *GSTs* de clase Mu de *T. thermophila*, 26 de ellos, al menos, estarían agrupados (Figura 50). De la clase Theta, 2 están agrupados e, igualmente, 3 de la clase Omega (Figura 50). Además, existe un elevado grado de homología entre genes próximos, llegando a alcanzar incluso porcentajes de homología del 100 %. Por ejemplo, esto sucede en la pareja de genes *TtGSTM28* y *TtGSTM29* separados por tan sólo 1.370 pb. Pero, sucede lo mismo en la pareja *TtGSTM6* y *TtGSTM7* que están distanciados por más de 10 Kb (Figura 50). Por lo tanto, independientemente de su cercanía o lejanía en el cromosoma, los genes *GSTs* pueden presentar una elevada homología, posible fruto de duplicaciones génicas.

La clasificación de las secuencias aminoacídicas inferidas de los genes *GSTs* presentes en *T. thermophila*, en las diferentes clases (descritas previamente), parece ser la correcta, tanto por la agrupaciones homogéneas de las mismas (por tipo de clase) que aparecen en el árbol filogenético de la Figura 55, como la distribución de algunas *GSTs*, seleccionadas de cada clase, con “*GSTs*-modelo” de otros organismos (Figura 56). Ambas aproximaciones confirman la correcta clasificación de estas *GSTs* de *T. thermophila*. Igualmente, un análisis 3D llevado a cabo en algunas secuencias *GST* (2 de cada clase) de *T. thermophila* confirma su correcta inclusión en cada tipo de clase (Figuras 57 y 58).

Actualmente, se conocen aproximadamente una docena de estructuras 3D de *GSTs* citosólicas (inferidas de su análisis cristalográfico), pertenecientes a plantas, animales o bacterias, y todas las estructuras analizadas presentaban una elevada conservación estructural 3D y una organización dimérica. Las *GSTs* de *T. thermophila* (y probablemente también las de *P. tetraurelia*) son, de momento, las únicas *GSTs* de protozoos estudiadas que se identifican con las de mamíferos, tanto a nivel de homología de secuencias como de estructura 3D, a diferencia de lo encontrado en otros protozoos como *B. japonicum* (Takada and Matsuoka, 2008) o *P. falciparum* (Perbandt et al., 2004).

Del análisis 3D llevado a cabo en cuatro *GSTs* (una representante de cada clase) de *T. thermophila*, podemos destacar los siguientes puntos:

- 1) El dominio-I (N-terminal) de las cuatro *GSTs* analizadas (Figuras 57 y 58) muestran la configuración clásica de una *GST* (configuración del dominio tiorredoxina), es decir; 4 láminas- β y 2 α -hélices distribuidas en la configuración $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3\beta_4\alpha_3$, el cual se encuentra muy conservada entre las *GSTs* citosólicas (Frova, 2006; Sheehan et al., 2001) (Figura 90).

Discusión

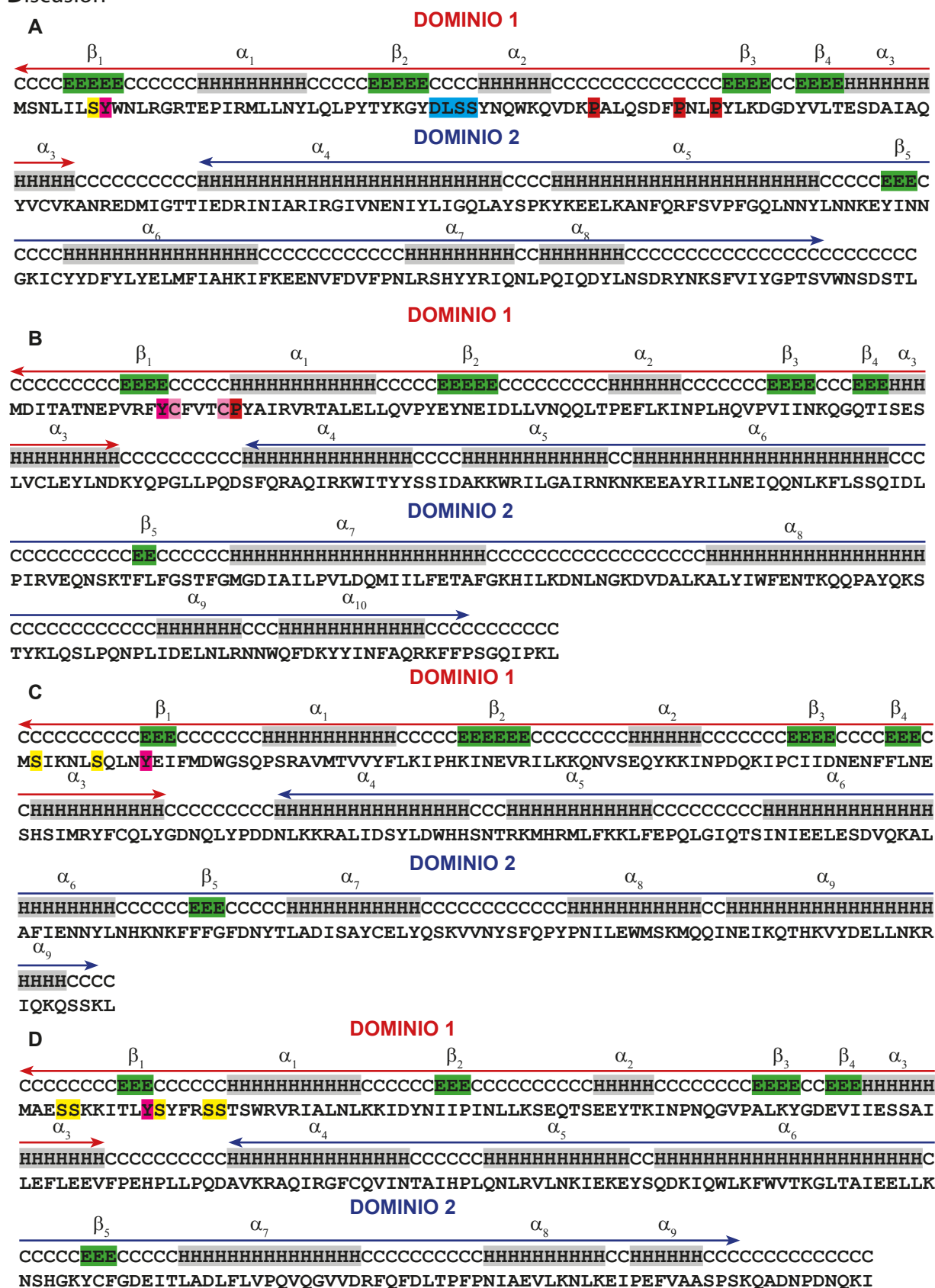


Figura 90. Esquema de las estructuras secundarias (generadas por el programa online PSIPRED) de las GSTs de *T. thermophila* seleccionadas para un análisis 3D como representantes de cada clase (Figuras 57 y 58). E: lámina β (en verde), H: hélice α (en gris), C: repliegue. Sombreado en fucsia se indica el residuo de tirosina (Y), en amarillo la serina (S), en azul la región que comprende el "lazo Mu", en rojo los residuos de prolina (P) y en rosa las cisteínas (C). A: TtGSTM47, B: TtGSTO1, C: TtGSTT1, D: GSTZ1.

2) El dominio-II (C-terminal) está constituido fundamentalmente por α -hélices (5-7), interrumpidas por una corta lámina- β (3-4aa). Este segundo dominio está menos conservado entre las GSTs (Frova, 2006; Sheehan *et al.*, 2001) (Figura 90).

3) Con respecto a la TtGSTM47 (elegida como modelo entre las 47 posibles GSTs-Mu de *T. thermophila*) (Figuras 57A y 90A), tiene 5 α -hélices en el dominio-II al igual que todas las GSTs de las clases Mu y Pi (Sheehan *et al.*, 2001). También, presenta un residuo de tirosina (Y) (localizado en la primera lámina β (β_1) del dominio-I o N-terminal) (Figura 90A), el cual es catalíticamente esencial para las enzimas de las clases Mu, Pi y Alpha (Sheehan *et al.*, 2001). Además, presenta el característico “lazo-Mu”, localizado entre β_2 y α_2 (Figuras 57A y 90A), el cual es típico de las GSTs de la clase Mu. Entre las regiones α_2 y β_3 del dominio-I, presenta un “lazo” rico en prolina (P) (Figura 90A), que igualmente está conservado en muchas GSTs citosólicas. Estos residuos no son necesarios para la catálisis de la enzima, pero mantienen una estructura catalíticamente competente (Frova, 2006). De todas estas similitudes con las GSTs de la clase Mu, se infiere la correcta clasificación de la TtGSTM47 dentro de esta clase.

4) La TtGSTO1 (Figuras 57B y 90B), tiene 7 α -hélices en el dominio-II (característico de la clase Omega) (Sheehan *et al.*, 2001). Tiene el residuo de tirosina (Y) en la lámina β_1 (Figura 90B), y un inusual residuo de prolina (P) en posición 19 en la región N-terminal (Figura 90B), lo que parece ser característico de esta clase (Sheehan *et al.*, 2001). Entre la lámina β_1 y la hélice α_1 tiene una región inusualmente rica en cisteína (C) (Figura 90 B). En el lugar activo de la enzima GST-Omega, un residuo de cisteína (que interacciona con el grupo -SH del GSH) hace la función del residuo de tirosina (en las GSTs Mu, Alpha o Pi) o del residuo de serina (en la clase Theta) (Sheehan *et al.*, 2001). En TtGSTO1, existen dos residuos de cisteína (Figura 90B), uno de ellos al lado del de tirosina (Y) localizado en la lámina β_1 . En este caso, ambos residuos Y o C, podrían potencialmente llevar a cabo la misma función (formando un puente disulfuro; (-CH₂-S-S-GS-) entre la cisteína y el GSH, o un enlace hidroxilo; (-O-H-GS) entre la tirosina y el GSH (Sheehan *et al.*, 2001). Por lo tanto, los elementos derivados del estudio estructural apoyan igualmente la correcta clasificación de esta GST en la clase Omega.

5) La TtGSTT1 (Figuras 58A y 90C) tiene 6 α -hélices en el dominio-II. La clase Theta de GSTs tiene en la región N-terminal catalítica (dominio-I) un residuo de serina (S) en lugar de uno de tirosina (Y) como otras GSTs (Sheehan *et al.*, 2001). En la región de la lámina β_1 del dominio-I de TtGSTT1 se localiza un residuo Y (residuo 11) y en las proximidades dos residuos S (residuos 2 y 7). Análogamente, en la proteína HsGSTT1, existe un residuo Y (residuo 6) formando parte de la primera lámina β , y en las cercanías un residuo S (residuo 11) que sería el encargado de participar en la acción catalítica. Con respecto a esta información, se ratifica la localización de esta GST dentro de la clase Theta.

6) La TtGSTZ1 (Figuras 58B y 90D) tiene 6 α -hélices en el dominio-II. A pesar de que en la mayoría de las GSTs citosólicas analizadas de la clase Zeta han sustituido el residuo catalítico tirosina (Y) por serina (S), la TtGSTZ1 mantiene el residuo Y (residuo 11) dentro de la lámina β_1 , junto con otros residuos de serina (S) (residuos 4, 5, 12, 16 y 17) (Figura 90D). La estructura general de las GSTs de clase Zeta, no son muy diferentes de las de otras clases de GSTs.

4.2 Consideraciones filogenéticas e implicaciones de la presencia de GSTs de clase Mu en ciliados.

Las enzimas involucradas en procesos de detoxificación, como las GSTs, han existido, tanto en procariotas como eucariotas, durante más de 2.500 millones de años (Nebert and Dieter, 2000). Las GSTs constituyen una superfamilia de proteínas muy antigua, las cuales se desarrollaron (según algunos autores) a partir de una proteína ancestral similar a tioredoxina como respuesta al estrés oxidativo (Sheehan *et al.*, 2001). Se piensa que las diferentes clases de GSTs surgieron (al igual que otras familias de proteínas) por duplicación génica seguida de divergencia. La constatación de numerosas copias (isogenes), con elevado nivel de homología, presentes en los genomas de muchos organismos, tanto unicelulares como pluricelulares, avala la hipótesis de la duplicación como mecanismo general de aparición de nuevas isoformas. En el caso extremo de *T. thermophila*, es aún más evidente la presencia de este mecanismo para la generación de nuevos isogenes. Este microorganismo (con una biología de tipo animal) presenta uno de los números más elevados de isogenes de GSTs detectados hasta ahora, acercándose al de algunas plantas (Tabla 22). Como se muestra en la Figura 55, el árbol filogenético de las diferentes GSTs de *T. thermophila* revela que dentro de cada clase han existido numerosas duplicaciones génicas, así por ejemplo; TtGSTM1, M2, M3, M4 y M5 parecen haber surgido por duplicación a partir de una de ellas, otro grupo con origen común es el que engloba a las GSTs M20, M21, M22, M23, M24, M25 y M26, todo el grupo Omega (O1 a O7) o todo el grupo Theta (T1 a T5), las cuales parecen haber surgido por sucesivas duplicaciones de una primera versión. Por lo tanto, y como ocurre para otros genes de este mismo ciliado, la gran mayoría de isogenes GSTs han surgido muy probablemente por duplicación génica.

El actual modelo que diferentes autores han propuesto para explicar la historia evolutiva de las GSTs, se podría resumir de la siguiente manera; la clase Theta de GSTs se propuso como las progenitoras de la familia, de tal forma que las específicas de Plantas (Thau y Phi) y las de mamíferos (Alpha, Mu y Pi) podrían haber sido originadas por duplicación génica a partir de las de clase Theta, lo cual pudo ocurrir antes de la divergencia de hongos y animales. Una visión más amplia de la evolución de las GSTs citosólicas ha sido revisada por Frova (2006), la cual

puede dividirse en dos fases. 1ª fase: Entre los especialistas existe un amplio consenso sobre la idea de que las tioredoxinas/glutaredoxinas son los elementos ancestrales de las cuales se originaron todas las GSTs solubles (citoplasmáticas y mitocondriales), al igual que otras tioredoxinas. Teniendo en cuenta sus características estructurales, se ha propuesto (Robinson *et al.*, 2004) que las GSTs citoplasmáticas y las Kappa han evolucionado independientemente a partir de proteínas del tipo tioredoxinas (TRX)/glutaredoxinas (GRX), por dos caminos separados. El camino seguido por las GSTs citoplasmáticas (Figura 91) partiría de un ancestro tipo glutaredoxina procariota (como la GRX2 de *E. coli*) monomérica, de la cual surgirían las GSTs de clase Lambda, los canales intracelulares de cloro (CICL) y las dehidroascorbato reductasas (DHAR). Luego, tras una etapa de dimerización se originaron las GSTs de clase Omega y Beta (Figura 91), las cuales mantenían la cisteína como el residuo del sitio activo y sin la capacidad de conjugarse con GSH. Sin embargo, teniendo en cuenta que la clase Beta tiene tanto la actividad tiol-disulfuro oxidoreductasa como la GSH transferasa, su aparición debería ser posterior a las de la clase Omega. La siguiente etapa evolutiva, según este modelo (Figura 91), sería pasar de la química de la cisteína a la de la serina. Las GSTs de las clases Theta y Zeta están presentes en todos los eucariotas (incluyendo hongos y los dos protozoos ciliados con genoma macronuclear secuenciado) (Tabla 22), por lo que podrían haber surgido tempranamente. Las clases Zeta y Theta son similares tanto en sus secuencias como propiedades bioquímicas, sin embargo algunos autores piensan que las de clase Zeta se separaron tempranamente en la línea eucariota (Frova, 2006). Las clases Phi, Tau (específicas de plantas) y Delta (específica de insectos) surgieron posteriormente (Figura 91), ya que son específicas de un grupo filogenético de organismos, junto con el elevado número de isógenos, su frecuente agrupación en reducidas regiones del genoma y la elevada similitud de las secuencias, son elementos que indican procesos de duplicación reciente. El siguiente paso (según el actual modelo) (Figura 91) marca una separación evolutiva de las clases de GSTs de mamíferos (Alpha, Mu y Pi) y la clase Sigma, al cambiar el residuo de serina por tirosina en la región catalítica de unión con el glutatión (sitio-G). La presencia de GSTs del tipo Sigma en vertebrados e invertebrados, sugiere que esta clase divergió antes de las clases Alpha, Mu y Pi, características de mamíferos.

La presencia de GSTs citoplasmáticas de la clase Mu en protozoos ciliados, tales como *T. thermophila* y *P. tetraurelia*, altera ciertos aspectos del modelo sobre la historia evolutiva de las GSTs citoplasmáticas, principalmente las de la clase Mu de mamíferos. Las principales modificaciones dentro de este modelo (Figura 91) que deberían ser consideradas son las siguientes:

- 1) Las GSTs de clase Mu, al existir también en protozoos ciliados (*Tetrahymena* y *Paramecium*), ya no se pueden considerar exclusivas de mamíferos. En el protozoo parásito, cau-

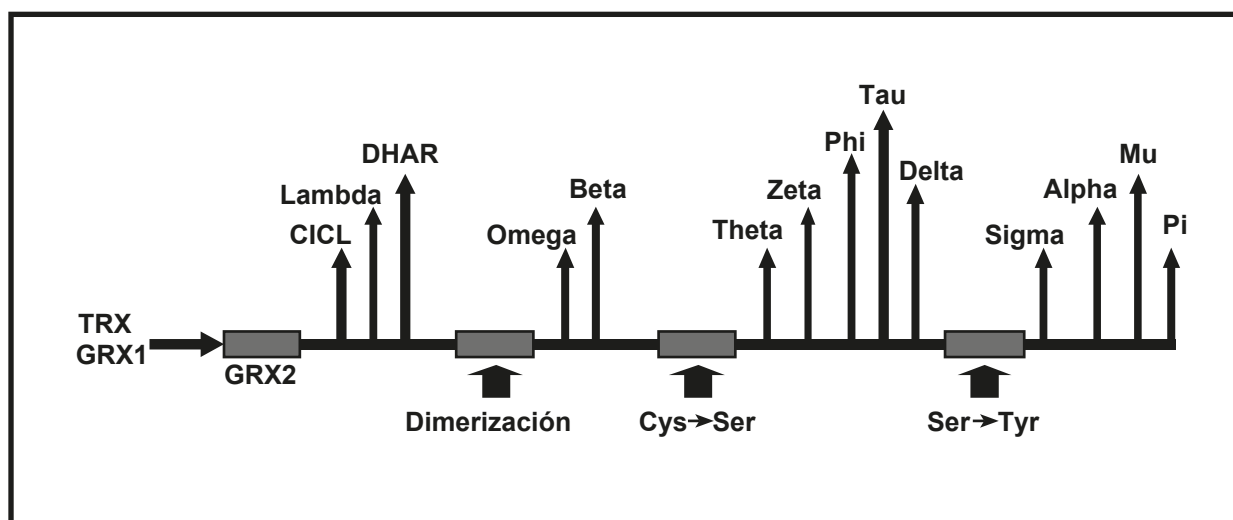


Figura 91. Esquema del modelo de historia evolutiva de las GSTs citosólicas (adaptado de Frova, 2006). Para una mayor explicación ver texto. TRX :Tiorredoxina, GRX: Glutarredoxina, CICL: Canales intracelulares de cloro, DHAR: Dehidroascorbato reductasa.

sante de la malaria, *Plasmodium falciparum* se describió una única y abundante GST (PfGST) (Perbandt *et al.*, 2004; Fritz-Wolf *et al.*, 2003), que originalmente se clasificó como de la clase Mu (Perbandt *et al.*, 2004), pero que, posteriormente, tras un análisis estructural 3D de sus cristales (Hiller *et al.*, 2006), se ha concluido que esta GST representa una nueva clase. Igualmente, las dos GSTs (BjGST1 y BjGST2) del ciliado *Blepharisma japonicum* (Takada and Matsuoka, 2008) no están relacionadas con ninguna de las clases de GSTs conocidas. Por lo tanto, son los protozoos ciliados oligohymenóforos (representados en *Tetrahymena* y *Paramecium*) los que, de momento, parecen tener GSTs identificables e integrables en la clase Mu. Como los protozoos ciliados datan del Proterozoico (Paleo-/Meso-proterozoico) (hace ~ 10⁹ años), son más antiguos que los hongos y, por supuesto, los vertebrados, por lo que la clase Mu de GSTs es más antigua de lo que se suponía.

2) Según el modelo evolutivo actualmente aceptado (Figura 91), la principales fases de transición en la evolución del lugar activo de las GSTs citosólicas son; un cambio de Cys por Ser (Cys → Ser) (paso de la clase Omega a Theta, Zeta o Phi) y un segundo cambio de Ser por Tyr (Ser → Tyr) (paso de las clases Theta, Zeta o Phi a Alpha, Mu o Pi), o en resumen: Cys → Ser → Tyr. En *Tetrahymena* (Figura 91), el sitio catalítico (sitio-G de unión al GSH) localizado en la lámina β_1 presenta una Tyr (Y₈) junto con una Ser (S₇), mientras que las típicas Mu de mamíferos presenta la Tyr (Y₇) sin Ser en sus cercanías. Curiosamente, tanto *P. falciparum* como *B. japonicum* tienen exclusivamente Tyr (Y₈Y₉ y Y₇ ó Y₈, respectivamente), a pesar de no considerarlas de la clase Mu (Hiller *et al.*, 2006; Takada and Matsuoka, 2008). Por lo tanto, en *Tetrahymena*, parece ser que en algunas GSTs consideradas dentro de la clase Mu persisten los residuos de serina

en la potencial región catalítica. En las Theta y Zeta suelen coexistir ambos residuos, aunque en una localización diferente pero aún en la región β_1 , así como; S_7/Y_{11} (TtGSTT1) (Figura 91C), Y_{11}/S_{12} (TtGSTZ1) (Figura 90D) de *T. thermophila*, Y_6/S_{11} en una GST-Theta humana ó Y_6/S_{11} en el hongo *Phytophthora infestant*. Aún en la GST- Omega (TtGSTO1) de *T. thermophila*, en la región β_1 , se presenta una Cys y una Tyr (Y_{13}/C_{14}). Por lo tanto, la presencia de Tyr (Y) en la región catalítica (sitio-G) no parece ser una novedad de las GSTs clase Mu de mamíferos, puesto que ya existían en GSTs de ciliados, coexistiendo con la Ser (GSTs-Theta y Zeta) y la Cys (GST-Omega).

Si mantenemos la línea evolutiva del modelo propuesto, pero adaptado a *Tetrahymena*, las transiciones aminoacídicas del sitio catalítico (funcionales o no) serían; **Cys**/Tyr → **Ser**/Tyr → Ser/**Tyr** (indicándose en negrita el aminoácido potencialmente activo o funcional del par presente en el sitio catalítico). En un próximo futuro, se tendría que llevar a cabo un análisis más extenso (en mayor número de microorganismos) e intenso de estas enzimas, para poder diseñar con una mayor fiabilidad la historia evolutiva de estas moléculas ubicuas.

Las GSTs son activas de forma dimérica, formando homo o heterodímeros, siempre que las dos subunidades sean de la misma clase. Debido al alto número de isoformas que aparecen en *T. thermophila*, son numerosas las posibles combinaciones para formar enzimas activas que pueden unirse a una amplia variedad de sustratos. En 1988 (Overbaugh et al., 1988), aislaron y purificaron una GST citosólica que es funcional como monómero y no como dímero en *T. thermophila*. Esta GST no fue identificada ni clasificada en ninguna clase, ni ha sido posteriormente secuenciada. La masa molecular que se estimó para esta proteína fue de 35 KDa, la cual no coincide con la masa molecular estimada de ninguna de las GSTs analizadas en este estudio. Las que más se asemejan a esta masa molecular son las TtGSTs de clase Omega con masas moleculares comprendidas entre 30 y 32 KDa. Todas las Omega-GSTs descritas hasta el momento son diméricas. Según el modelo evolutivo actualmente aceptado (Figura 91), las GSTs de clase Omega son las primeras que surgen tras la dimerización. Por lo tanto, si es cierto que *Tetrahymena* tiene enzimas de clase Omega que funcionan como monómeros, deberíamos plantearnos el modelo actual de la historia evolutiva de las GSTs. Este nuevo planteamiento del modelo tendría que tener en cuenta la presencia de GSTs de clase Mu en ciliados, junto con GSTs de clase Omega que actúan como monómeros.

Las GSTs específicas de grupo taxonómico son bastante abundantes, lo que indica, independientemente de la antigüedad de la familia de GSTs, que una gran expansión ocurrió más recientemente, en las diferentes líneas de organismos independientemente de su localización en el árbol filogenético. La rápida evolución de las GSTs reflejada en la gran diversidad de isoformas existente entre especies y dentro de la misma especie, se traduce en una respuesta del or-

ganismo para adaptarse al estrés ambiental. Por lo tanto, la ventaja adaptativa de estas enzimas depende de su versatilidad, como puede ser la capacidad de detoxificación frente a un amplio rango de compuestos diferentes, y la rapidez con que responden los genes (*GST*) a los cambios ambientales. Durante el curso de la evolución, los requerimientos celulares para responder a diferentes tipos de compuestos tóxicos se han resuelto por dos caminos:

1) incrementando el número de genes de *GST* a través de múltiples ciclos de duplicación génica, y

2) favoreciendo una rápida diversificación de los nuevos genes, originados por duplicación, con respecto a la especificidad de sus segundos sustratos, mientras que mantiene la función fundamental de conjugación del GSH con compuestos tóxicos. Es decir; mantener conservado el sitio-G y altamente variable el sitio-H. En resumen, la familia de GSTs se caracteriza por presentar una arquitectura modular en la que surgen variaciones específicas sin la ruptura de la capacidad de unir GSH junto con su actividad catalítica. Esta estrategia, que conduce a la obtención de un alto grado de plasticidad de una manera rápida y económica, es, igualmente, bastante común y recurrente en la naturaleza.

4.3 Otras características destacables de algunas GSTs de *T. thermophila*.

En la Tabla 13, en la que se recogen las características generales de las diferentes GSTs de *T. thermophila*, destacan, por su tamaño, tres GSTs asignadas a la clase Mu (TtGSTM1, TtGSTM8 y TtGSTM45, de 805, 725 y 761 aa, respectivamente) en relación al tamaño promedio de las GSTs (200-300 aa) (Frova, 2006). Tras llevar a cabo un análisis más detallado de las secuencias de estas proteínas (Figura 92), observamos que TtGSTM1, además de presentar el dominio típico de GST (del residuo 24 al 97) presenta otro en forma de dedos de zinc (del residuo 441 al 480), junto con dos dominios transmembranas (regiones comprendidas entre los residuos 323-345 y 366-385) (Figura 92). Los dedos de zinc (ZnFs) son probablemente los dominios proteicos más versátiles, así las proteínas que contienen ZnFs comprenden una de las superfamilias de proteínas eucariotas más abundantes (constituyen ~2 % de las proteínas codificadas por el genoma humano) (Matthews and Sunde, 2002). Dentro de este grupo de proteínas se distinguen diferentes (al menos 14 bien diferenciadas) clases o familias con distintas funciones dentro de la célula; interacciones entre proteínas (Borden, 1998) y otras macromoléculas como ADN, ARN y lípidos. Una de estas familias es la denominada RING (*Really Interesting New Gene*) o familia “RING-finger”. Esta familia es bastante ubicua, encontrándose en animales, plantas, hongos y virus, incluyendo varias proto-oncoproteínas humanas, también como proteínas involucradas en el desarrollo y

A

MFTKNQETVLQCFGMQLFFFFQMFI¹LGYWESRGIAQAIRLLLEYLEYTEKQYYETE²QWFEKDKKELNT
NFPNLPYLIDGEVVVTESIVIPYLIK³KLKRYELLGQNSDGSFNQNEIIFLQLLTIMKDLRYDIYISTKV
PSFREEKHKLYNEKYFVTLQKLI⁴RQLDKKQYLLNFTYADIMFYDLLRYIEFIYPEKSILPEYKERIENTI
PQIKKYLD⁵TKENKIFILERMKDLFXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXTSENQFQNTYIF
ELTLMIYMGDPLSSNQKIRISLICLDSCVLRMYIKAFNTNTSV⁶DSYLILFFLEYLLISLNIIFPAIKYFTI
AFEMFTYSHFQNKNN⁷FMVLEFVLTVC⁸KLCIQLYMRIKYMLLFPFIVDLIENLIQLYNTIVKFFSSVKLL
RLLNKLPDVNLEEIEEIDNT⁹CLICLSEIKHGKIGCGHFFHKNCLKELIQGKSNQLCPKC¹⁰RSPINIEQAI
KDHQNESKNQKKKNSAIFKINFIKSQKDSGEQKDSKNQEQQTESKRKF¹¹FENATIQEKIIFTLDDLINN
IGNMIKSQINEPKIIQ¹²RVKGLIQDILKLEELIQTNEQK¹³KLKVELNLENIFDFSQLLASTNTSLKKCGAIS
YGLPKIASYNRTFADECLRKKIELMNL¹⁴LLNCQRDMLLQTMFFGITKNLTNLKQDESENYYQEQKGSHT
NDGLFKTQSLNNNNSSLAGETKKITKD¹⁵ISQLSKNTSVIVDETSIFQKNNSKIDPQEEERERRLAWIEKL
QSQVSQSNEQQNQQQEQQQQQNQNNQ¹⁶QDALASN

B

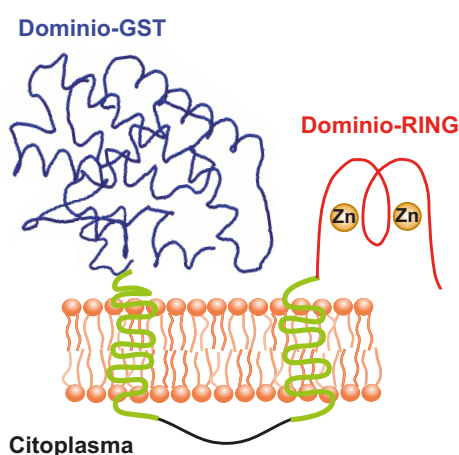


Figura 92. A) Secuencia nucleotídica de la proteína TtGSTM1. En color azul se señalan los dominios GST (dominio-I y dominio-II), en color verde los dominios transmembrana y en color rojo el dominio "RING-finger". **B) Hipotética estructura 3D de la proteína TtGSTM1** (generada por el servidor EML). En verde se representan los dominios transmembrana, en azul el dominio GST y en rojo el dominio "RING-finger".

replicación viral. El dominio "RING-finger" (con un total de 40-60 aa) incluye 8 residuos aminoácidos (Cys e His), con capacidad de unir 2 átomos de Zn^{2+} por dominio. El sistema de unión a los iones Zn^{2+} es único en el dominio "RING-finger", como se ha mostrado tras el análisis de la estructura 3D del mismo, y se denomina "cross-brace" (cruz-reforzada). La estructura consenso de este dominio "RING-finger" es: Cys- X_2 -Cys- X_{9-39} -Cys- X_{1-3} -His- X_{2-3} -Cys/His- X_2 -Cys- X_{4-48} -Cys- X_2 -Cys, en donde los residuos del primer par (Cys1 y Cys2) unen un átomo de Zn con el tercer par (Cys4 y Cys5), y el segundo átomo de Zn queda unido por los residuos del segundo par (Cys3 e His1) y el cuarto par (Cys6 y Cys7). Por lo tanto, aunque la proteína con un dominio "RING-finger" une 2 átomos de Zn^{2+} por molécula, no forma dos mini-dominios separados sino una única unidad estructural integrada. Pueden existir dos tipos de dominios "RING-finger"; RING-H2 o RING-HC, dependiendo del quinto tipo de residuo (del tercer par) que coordina la unión con Zn, que puede ser una Cys o una His. Es -H2 cuando tiene 2 residuos de His, o HC (cuando el dominio sólo tiene un residuo de His y otro de Cys) (Fang et al., 2003). (Figura 93 y 94).

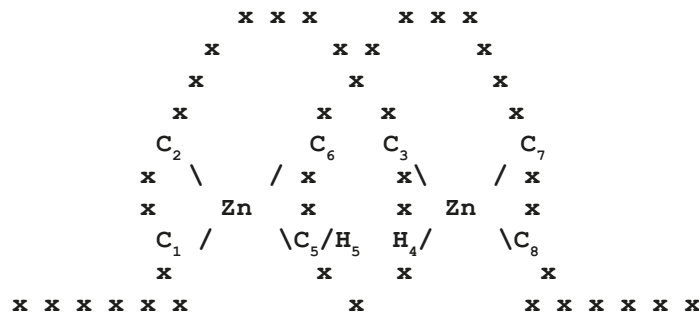


Figura 93. Esquema de la estructura 2D de la secuencia aminoacídica del dominio RING-finger estándar (Cys-X₂-Cys-X₉₋₃₉-Cys-X₁₋₃-His-X₂₋₃-Cys/His-X₂-Cys-X₄₋₄₈-Cys-X₂-Cys). En subíndice se indica la posición de los 8 residuos implicados en la interacción con el ión Zn²⁺. En función del aminoácido que ocupe la posición 5 se diferencian dos tipos, el dominio RING-HC si es una cisteína o el dominio RING-H2 si se trata de una histidina.

<i>Mus musculus</i>	51	NCAICRNHIMDLCECQANQ----	ASATSEECTVAWGVCNHAFFHISRWLKTR---	QVCPLDN	109
<i>Feldmannia (virus)</i>	119	VGVICQEK-----	TSFETSVRILDGGEFFHAAVQEWLKR---	PTOPTOR	162
<i>Coprinopsis cinerea</i>	321	TEIICREEMVFQENQPQATP----	NDREGPNMTPKKLPCGEIFFYILRSWLERQ---	QSCPTOR	379
<i>TtGSTM1</i>	408	TCLICLSEIKHG-----	KKIGCGHFFHKNLKELIQGKSN-QLCPKOR	450	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	92	CPICLEDLK-----	KVDNDDDKVVVCLSKCNESFHMNIFSWLRES---	QDPIOR	141
<i>Leishmania braziliensis</i>	325	TAICQEELSGTFSTATADAAPTATSPSNTDKACVKLLNCSHAFHKVINQWLTQS---	KTCPIOR	389	
<i>Perkinsus marinus</i>	116	QGGVCLCPLEAVDVPDPQNGSSSSSSSTAEEIIQLPRCGHIFHAKAREWLKGFGR--	TOPIDR	180	
<i>Micromonas sp.</i>	350	CSVCLC---DAEDGD-----	AMRTLPCMEVYHADIKWLGEHS---	TCPIOR	394
<i>Oryza sativa</i>	240	ENICFE---SAKDP-----	VVTP-CGLFCWPIYQWLHGHSEHSDCPVK	283	

Figura 94. Alineamiento de dominios RING-H2 / HC de proteínas de diversos organismos. Los números de acceso de las secuencias son: *Mus musculus* 4A0K_B, *Coprinopsis cinerea* XP_001830470, *Arabidopsis thaliana* Q9FI95, *Leishmania braziliensis* XP_001565234, *Micromonas sp.* C1FFN1, *Oryza sativa* Q84SC7 (con dominio RING-HC). En la parte superior se indica la posición de los residuos que intervienen en la unión con el Zinc. En color rojo se señalan las cisteínas y en verde las histidinas.

El dominio “RING-finger” de TtGSTM1 está constituido por los siguientes residuos: Cys-X₂-Cys-X₅-His-X₅-Cys-X-His-X₂-His-X₂-Cys-X₁₂-Cys-X₂-Cys (Figura 94), con lo que incluye 9 residuos Cys o His de un total de 39, incluyendo tres residuos de His. El quinto residuo que actuaría en la unión con un átomo de Zn, sería una His, por lo que este dominio se podría clasificar como RING-H2 (aunque tiene 3 residuos de His). Como no conocemos si este residuo extra de His interviene o no en la unión con Zn, no podemos aventurarnos a introducir un nuevo tipo o clase de dominio “RING-finger”. Sin embargo, existen depositados en bancos de secuencias otros dominios “RING-finger” que presentan 3 residuos de His, como el del alga verde *Micromonas sp.* (C1FFN1).

Todos los dominios RING-H2 tienen actividad de ubiquitinización (Fang et al., 2003). Por lo tanto, los motivos “RING-finger” definen a una familia de proteínas que media en el proceso de ubiquitinización o marcaje molecular para la proteólisis. Otra posible función de las proteínas que contienen motivos “RING-finger” es la de participar en el ensamblaje macromolecular de proteínas (Borden and Freemont, 1996). La proteólisis dependiente de ubiquitina ocurre por

la adición covalente de una cadena de poliubiquitina a una proteína-diana, la cual una vez así marcada puede degradarse en el complejo proteolítico proteosoma 26S (dependiente de ATP y ubiquitina). La ruta de ubiquitinación involucra a tres tipos de enzimas, conocidas como E1, E2 y E3. E1 y E2 son enzimas que conjugan ubiquitina. La E1 actúa activando la ubiquitina. Una vez activada, es trans-esterificada a una Cys conservada de la enzima E2. La enzima E3 es una ubiquitina-proteína ligasa, responsable del reconocimiento del sustrato o la proteína-diana y promover la poliubiquitinización de la misma. Muchas enzimas E3 son proteínas con un motivo “RING-finger”, y este motivo está implicado en la transferencia de ubiquitina desde la enzima E2 a la proteína-diana (Freemont, 2000).

No hemos encontrado en la actual bibliografía sobre GSTs o sobre proteínas con motivo “RING-finger”, ninguna referencia sobre la existencia de GSTs con un dominio de este tipo, y, por consiguiente, con una actividad similar a enzimas E3 (ubiquitina-ligasa), además de la propia actividad glutatión transferasa.

Tanto la secuencia homóloga a GST como el motivo “RING-finger” se localizan en la región no citoplasmática, pudiendo ser el exterior celular o el interior de algún tipo de vesícula como endosomas o lisosomas. Se podría tratar de una GST anclada en una unidad de membrana de un orgánulo o de la película del ciliado. Además de las diversas actividades catalíticas asignadas a las GSTs, tales como; transferencia de GSH, glutatión peroxidasa, isomerasa, etc., a las GSTs se les ha asignado otras actividades no catalíticas, tales como; ligación con moléculas hidrofóbicas, modulación de las quinasas por interacción proteína-proteína u otras interacciones entre proteínas (Zimniak, 2007). El motivo “RING-finger” de esta GST podría tener tanto una función de interacción entre proteínas como la de ubiquitinización, esta última facilitaría la proteólisis de determinadas proteínas dañadas por estrés celular. De hecho, se conoce (Leach et al., 2011) que la ubiquitinización juega un papel importante en la degradación de proteínas desnaturalizadas por estrés ambiental.

La proteína codificada por el gen *TtGSTM8*, también posee dos dominios transmembrana que separan igualmente dos estructuras diferenciadas, una GST y un dominio GCC (*Golgi Coiled-Coil protein*) (Figura 95). Las proteínas con dominios GCCs están involucradas en el reclutamiento de otras proteínas, para formar diversos complejos proteicos importantes en la biogénesis y localización de las membranas del aparato de Golgi (Gillingham and Munro, 2003). El dominio GCC de esta GST de *Tetrahymena* es homólogo a la proteína GCC185 de humanos (44% de homología) cuya función es dirigir los endosomas al Golgi y mantener la estructura de este orgánulo, ya que en células carentes de esta proteína el Golgi está desorganizado (Derby et al., 2007). Ambos dominios, tanto GST como GCC, están localizados en el exterior celular o en

el interior de vesículas pero no en el citoplasma. Al igual que en la TtGSTM1, no hemos encontrado en la actual bibliografía ninguna notificación o publicación previa en donde se describa GSTs con este dominio GCC. E igualmente, esta GST (TtGSTM8) de *Tetrahymena* podría estar involucrada en la interacción con otras proteínas, que podrían estar implicadas en la organización y/o función del sistema de Golgi.

A

```

MITLQTAIIFQILIIQVLTQWDCPQNSSFSPOFYQCICNQSYFQDFYINQCQLCQTNSTSSQPQYVQWMN
SLSCDLCLPNFYNEKNSQVHVDNRQVPVCIECPQSGTNQANIDNFQISSCSICLQNYMTNPSSQSPT
LNSAQCLPCPNGLTSSGAQTVDQSVCSNCAINYMAQSSIAASQNNNNQGVAAQCLVCPQSGGTLEDLNI
QGDISQCSICLENYFMVSPAIQSAQGIQPSAAQCISCPNNSYNPKNSQQGYCTCYDSNATPLSSQVQSCN
CKNGYYGVSATSQNAPSGCFPCPQGGYNSQTQHNCQTCPSKFVTNLDQSGCVCNVAGLGVILDQSTNNC
TCKNGYQEDIS SLSGCSSCPQGFYSNSSTSFKCISCPSGSQT NNDQSNCICNDNSLAVYFDPISISCKCQ
KDYFGNPSQATLATIGSCTPCPTKFQATFSQNEIMKSQCV FSTFQNFISFSLVLAATQLCS NNQVDCIN
QKIKNNQKLNFIR IMITFGYWNIRGFGQPIRFLLAYLGVKYTNKTYASLEEWFGKDKDNLGLEFPNLE
YLIDGDVKLTESFAIPVYLIKKYKQFQLLGLQADGSSTNKEVKVTQ LMGVIRDIAKEINLTCTFRPDPFYEV
KEKVYTEKVEYMFKKLTNFLGNKLFLLESLTADFHFYELVNHVQYIYPQAMTAALTAYLKRFEENLPQIK
EYIANPNINLKAHLPGFMATWTGPQ
    
```

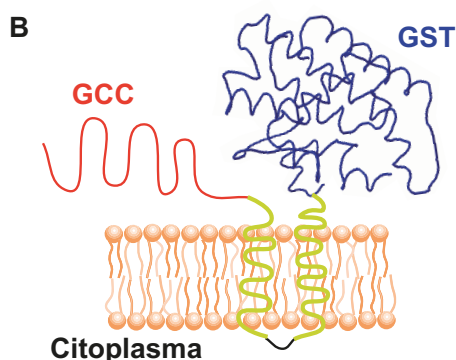


Figura 95. A) Secuencia nucleotídica de la proteína Tt-GSTM8. En color azul se señalan los dominios GST (dominio-I y dominio-II), en color verde los dominios transmembrana y en color rojo el dominio GcC. **B) Hipotética estructura 3D de la proteína TtGSTM8** (generada por el servidor EML). En verde se representan los dominios trasmenbrana, en azul el dominio GST y en rojo el dominio GCC.

La proteína TtGSTM45 presenta también dos dominios transmembranas (entre los residuos 173-195 y 454-476, respectivamente) y un dominio GST (entre los residuos 6-81), pero en este caso el dominio GST se encuentra en el lado del citosol o citoplasma (Figura 96).

Se han aislado y caracterizado dos GSTs de hígado de ovejas y de humanos, asociadas a membrana y clasificadas como Alpha-GSTs (Prabhu *et al.*, 2001; 2004). Además estas enzimas son también activas en forma dimérica. Pero ninguna de estas dos proteínas presenta dominios transmembrana y se desconoce el mecanismo por el que se anclan a la membrana. Por lo tanto, no se ha descrito hasta el momento ninguna GST de tipo citosólica con dominios transmembrana.

La característica común entre estas tres GSTs de tipo Mu es presentar dominios transmembrana adicionales al dominio GST, lo cual hace que estas GSTs estén ancladas en unidades de membrana respetando el dominio GST que puede estar localizado o expuesto en la cara

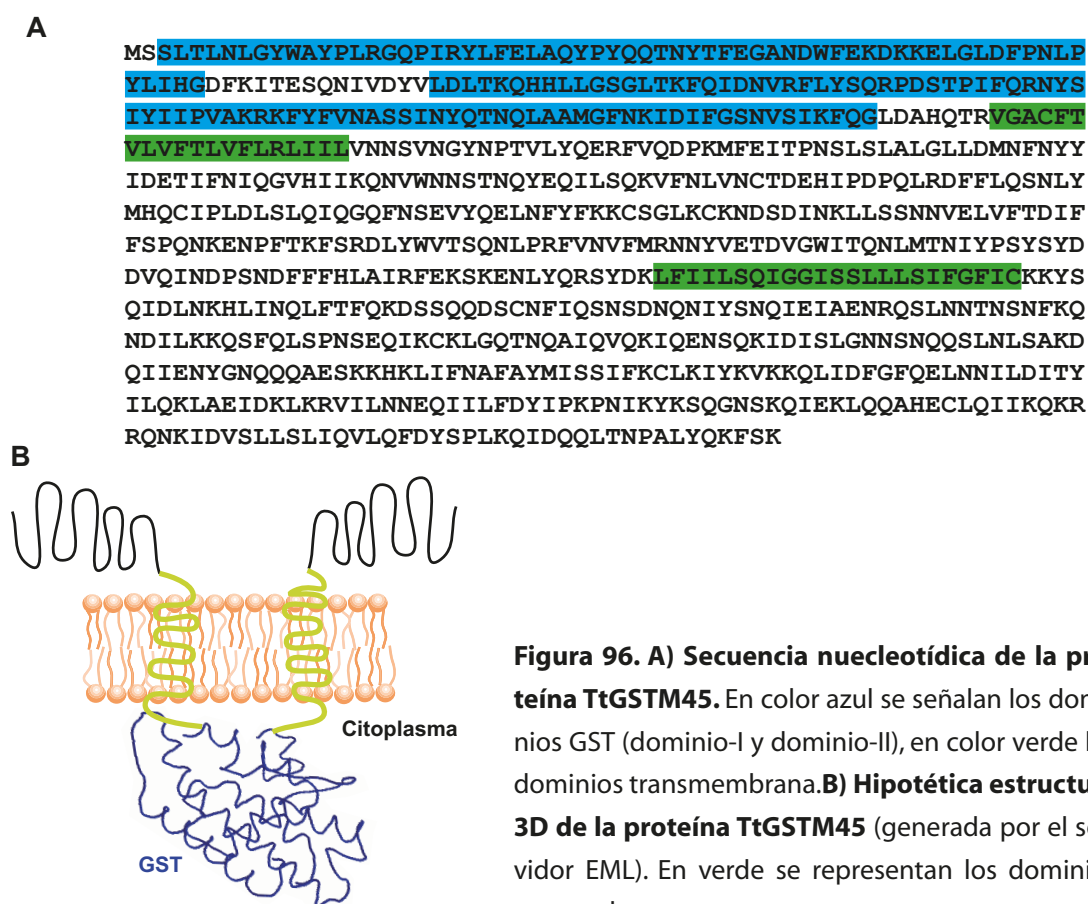


Figura 96. A) Secuencia nucleotídica de la proteína TtGSTM45. En color azul se señalan los dominios GST (dominio-I y dominio-II), en color verde los dominios transmembrana. **B) Hipotética estructura 3D de la proteína TtGSTM45** (generada por el servidor EML). En verde se representan los dominios transmembrana.

externa (hacia el citoplasma) o interna (hacia el interior del orgánulo) de la bicapa fosfolipídica. Los dominios GSTs de estas tres proteínas; TtGSTM1, TtGSTM8 y TtGSTM45, presentan homología con las típicas GSTs citosólicas ("solubles") de clase Mu, y por lo tanto, no asociadas a membranas. Ello constituye, por lo tanto, una interesante excepción al encontrar tres GSTs con motivos de GST citosólica pero asociadas a membrana. Estas tres GSTs no debemos confundirlas con aquellas que se clasifican como GSTs asociadas a membrana o microsomaes (MAGPE) que tienen una conformación y un origen diferente a las GSTs citosólicas (Frova, 2006). La superfamilia de proteínas MAGPE o GST microsomaes forman homotrimeros embebidos en una unidad de membrana, y se han descrito en procariotas (no en Arqueas), plantas, insectos y vertebrados. Aunque muchas de ellas están involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos, algunas tienen funciones de detoxificación, incluyendo una elevada actividad glutatión peroxidasa y protegiendo la membrana de la acción de lípidos hidroperóxidos (Jakobsson *et al.*, 2000). En el genoma macronuclear de *T. thermophila* hemos detectado dos genes que codifican para presumibles MAGPE, que hemos denominado *TtMAGPE1* y *TtMAGPE2*, y que son diferentes a los tres que codifican GSTs de clase Mu (TtGSTM1, TtGSTM8 y TtGSTM45), antes citados. Las secuencias aminoacídicas inferidas presentan tres regiones transmembrana de 23 residuos cada

una, en ambas proteínas, y un análisis 3D de las mismas muestra homología estructural (con un valor-E de 1 ó 2×10^{-7} y una precisión del 100%, respectivamente) con GST microsomales. En un próximo futuro estudiaremos la expresión de ambos genes MAGPE, junto con un más intenso análisis bioinformático.

4.4 Sobre la inducción y niveles de expresión de los genes GSTs de *T. thermophila*.

La expresión de las GSTs depende tanto de factores endógenos como exógenos. Entre los endógenos se distinguen el estado de desarrollo celular, factores sexuales y específicos de tejido (Eaton and Bammler, 1999). Por ejemplo, en humanos, la clase alfa de genes GSTs se expresa preferentemente en hígado, riñón y testículos, mientras que las GSTs de clase Pi alcanzan altos niveles de expresión en cerebro y pulmón, y no se expresan en hígado (Hayes and Pulford, 1995). Otras diferencias del nivel de expresión se muestran durante el desarrollo del organismo. Así, en humanos, mientras los genes GSTs de clase Alfa se expresan tanto en adultos como en fetos, la GSTP1 (clase Pi) se expresa en tejidos fetales pero sus niveles van disminuyendo a lo largo del desarrollo y desaparece en adultos. Por otro lado, los genes GSTs de clase Theta no se expresan en hígado fetal y sí en adultos (Mathew *et al.*, 1992b; Mera *et al.*, 1994). Además de de estos factores endógenos que afectan a la expresión de los genes GSTs, existen múltiples agentes externos que inducen su expresión, tales como; compuestos xenobióticos, compuestos electrófilos y muy diversos agentes orgánicos e inorgánicos productores de estrés oxidativo (Hayes and McLellan, 1999; Hayes *et al.*, 2005).

El elevado grado de homología entre algunos de los genes GSTs de *T. thermophila*, nos ha impedido estudiar la expresión de todos los 63 genes individualmente, ya que no se pueden diseñar cebadores que discriminen entre dos genes que presenten un alto grado de homología. Por esta razón, nuestro análisis de expresión por RT-PCR cuantitativo se ha limitado al estudio individual de algunos de ellos, o a grupos de genes muy similares (expresión de agrupaciones génicas parálogas).

Existen datos (algunos publicados y otros aún no) de genotecas de expresión del ciliado *T. thermophila* en diversas condiciones, tales como; el ciclo crecimiento-división (medio SPP, 30°C, densidad celular 2×10^5 células/ml) (Fillingham *et al.*, 2002), conjugación (Turkewitz, A.P., datos no publicados), inanición (1-6h) (Turkewitz, A.P., datos no publicados), estrés químico (diferentes concentraciones de DDT y TBT, medio de cultivo triptona y extracto de levadura a 30°C, densidad celular 2×10^5 células/ml) (Miao *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007) o estrés producido por metales (Cd a 11 mM ó Cu a 500 mM, durante 1h) (el autor de estas genotecas no distingue los ADNc derivados de cada una de ellas) (Coyne, R.S., datos no publicados), algunos de estos

datos se recogen en la página Web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene>), de donde hemos extraído aquellos que se refieren a los genes *GSTs* y que se reflejan en la Tabla 23. Como se muestra en dicha tabla, de un total de 63 genes *GSTs* detectados en *T. thermophila* (Tabla 12) sólo 17 (~27 %) se han registrado como ADNc entre las diversas genotecas de expresión obtenidas bajo diferentes condiciones. De los 47 genes *TtGSTs* de clase Mu se ha detectado la expresión de 10 (~21 %) de ellos (Tabla 23), siendo *TtGSTM13* y *TtGSTM23* los que más se expresan en las condiciones utilizadas de las distintas genotecas (Tabla 23). Igualmente, se han detectado 3 (~60 %) de la clase Theta (Tabla 23) de un total de 5 descritos (Tabla 22), 1 (~14 %) de la clase Omega de un total de 7, 1 (50 %) de la clase Zeta de un total de 2, y los 2 (100 %) sin clasificar (específicos de *T. thermophila*) (Tabla 23). La mayoría de estos genes *GSTs* aparecen en las genotecas de conjugación (un total de 65 genes *GSTs*) e inanición (36 genes *GSTs*) (Tabla 23). La conjugación se induce por inanición, por lo que en ambos casos está presente la ausencia de nutrientes. El gen *TtGSTM13* es el que más se expresa en conjugación (16 clones) (Tabla 23), de este gen no hemos podido analizar su expresión por RT-PCR cuantitativa debido a su elevada homología con otros genes *GSTs* de clase Mu (Figura 53), lo que dificulta el diseño de cebadores específicos y exclusivos para diferenciar este gen de otros similares. Algo parecido ocurre (Figura 53) con el gen *TtGSTM23* el segundo que más se induce (9 clones) entre las genotecas analizadas (Tabla 23), el cual tiene hasta un 95-96 % de homología con los genes *TtGSTM24* y *TtGSTM25* (Figura 53).

En nuestro grupo de investigación hemos obtenido y analizado varias genotecas de expresión a partir de poblaciones de *T. thermophila* sometidas a diferentes metales pesados (datos no publicados), y en una de ellas (tratamiento con As^{5+} durante 1 h) hemos detectado la presencia de dos clones (ADNc) que codifican *GSTs* de la clase Mu, y que se han identificado como los genes *TtGSTM23* y *TtGSTM32*. Estos genes no han sido estudiados por RT-PCR cuantitativa en el presente trabajo, ya que ambos presentan un 99 % de homología con otros (Figura 53), lo que hace inviable el poder diseñar cebadores que los puedan distinguir.

Recientemente, se ha analizado la expresión de genes en *T. thermophila* en diversas condiciones (ciclo crecimiento-división, conjugación e inanición), utilizando una micro-matriz o *microarray* (Miao *et al.*, 2009). En las Figuras 97, 98, 99, 100 y 101 se muestran los niveles de expresión (según la micro-matriz) de las diferentes clases de genes *GSTs* que hemos seleccionado para el análisis de su expresión en el presente trabajo. En la Figura 97, se muestran los genes *GSTs* de clase Mu. Durante el crecimiento de *T. thermophila*, es el gen *TtGSTM40* (de los seleccionados) el que más se expresa, seguido de *TtGSTM47*, *TtGSTM18*, *TtGSTM15* y *TtGSTM46* (Figura 97A). Durante la inanición (hasta 24 h), existe un descenso paulatino de la expresión del gen

Gen	Genotecas de expresión						Total
	Estrés químico ¹ (2.753)	Metales pesados ² (3.200)	Conjugación (21.069)	Inanición ³ (19.554)	Crecimiento-División (24.102)	Condiciones no especificadas	
<i>TtGSTM3</i>			2 (0,009)				2
<i>TtGSTM11</i>	5 (0,18)	2 (0,06)	2 (0,009)		1 (0,004)		10
<i>TtGSTM12</i>			6 (0,03)	5 (0,03)	1 (0,004)		12
<i>TtGSTM13</i>			16 (0,08)	2 (0,01)			18
<i>TtGSTM15</i>		1 (0,03)	4 (0,02)	5 (0,03)			10
<i>TtGSTM16</i>			4 (0,02)	5 (0,03)			9
<i>TtGSTM18</i>	1 (0,03)		5 (0,02)				6
<i>TtGSTM23</i>	1 (0,03)	9 (0,3)	6 (0,03)		1 (0,004)		17
<i>TtGSTM44</i>	1 (0,03)	1 (0,03)		3 (0,02)	1 (0,004)		6
<i>TtGSTM46</i>			3 (0,01)				3
<i>TtGSTT2</i>	1 (0,03)		6 (0,03)				7
<i>TtGSTT3</i>	1 (0,03)		2 (0,009)	2 (0,01)		2	7
<i>TtGSTT5</i>			3 (0,01)				3
<i>TtGSTO7</i>			2 (0,009)	5 (0,03)			7
<i>TtGSTZ1</i>	2 (0,07)			3 (0,02)	1 (0,004)	10	14
<i>TtGSTN1</i>	2 (0,07)	1 (0,03)	4 (0,02)	6 (0,03)	1 (0,004)		14
<i>TtGSTN2</i>					7 (0,02)	8	15
Total	14 (0,50)	14 (0,43)	65 (0,30)	36 (0,18)	13 (0,05)	20	162

¹: diferentes concentraciones de DDT y TBT. ²: Tratamientos con CdCl₂ (11 mM, 1 h) ó CuSO₄ (500 mM, 1 h). ³: Inanición de 1-16 h.

Tabla 23. Aparición de ADNc codificantes de diferentes GSTs de *T. thermophila* en diferentes genotecas de expresión (véase texto para más información). Cada cifra indica el número de clones localizados en cada genoteca para cada tipo de gen *GST*, y la cifra entre paréntesis muestra el % en que cada gen *GST* aparece en cada genoteca respecto del resto de los genes identificados. El total de clones (ADNc) analizados e identificados en cada genoteca se indica entre paréntesis debajo del nombre de la genoteca.

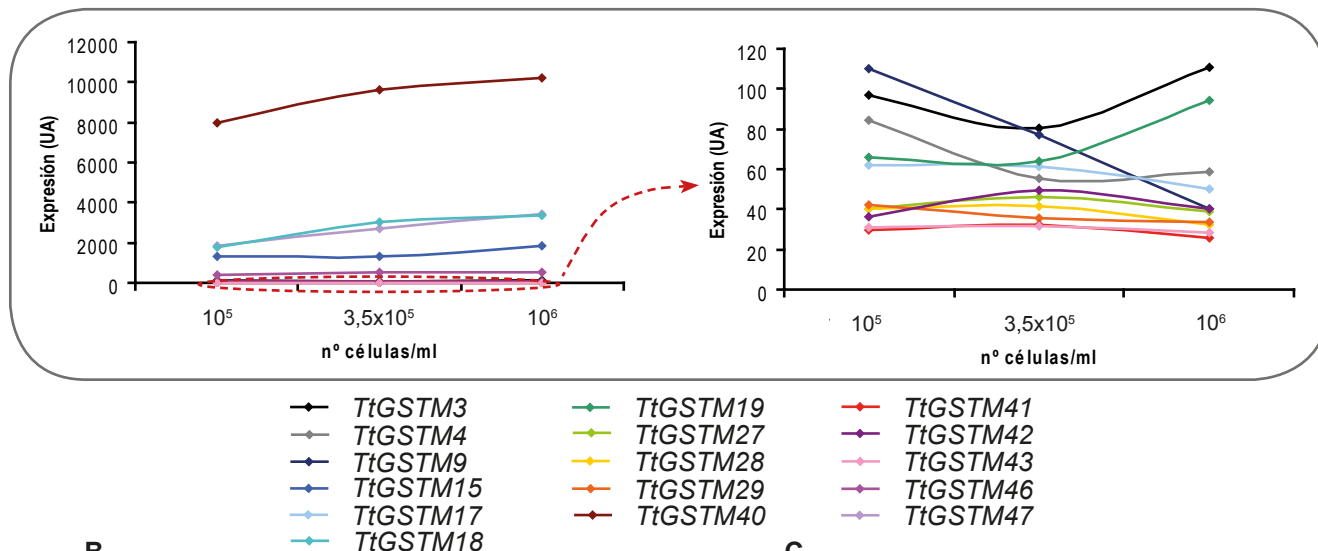
TtGSTM40, mientras que el resto de los seleccionados mantienen niveles similares y constantes a lo largo de las 24 h de inanición, a excepción de los genes *TtGSTM15* y *TtGSTM47* que también disminuyen a lo largo del tiempo (Figura 97B). Bastante diferente son los perfiles de expresión mostrados por estos genes durante las diferentes fases del proceso de conjugación (Figura 97C). Existe un descenso inicial de los valores de expresión del gen *TtGSTM40* y luego incrementa considerablemente hasta alcanzar un pico de máxima expresión entre las 12 -14 h, descendiendo posteriormente de nuevo (Figura 97C). Esta fase de máxima expresión de este gen corresponde con aquella en que las células son ya exconjugantes, cuando el viejo macronúcleo experimenta apoptosis o degradación junto con uno de los micronúcleos. El gen *TtGSTM46* presenta un pico de mayor expresión hacia 4-6 h de iniciada la conjugación (Figura 97C), en donde ocurre la meiosis micronuclear con la degradación de 3 productos micronucleares meióticos, la mitosis post-meiótica haploide y el intercambio y unión de los pro-núcleos (fertilización). El gen *TtGSTM47* presenta un pico hacia las 12 h de iniciada la conjugación, mientras que *TtGSTM15* y *TtGSTM9* tienen picos de máxima expresión hacia las 8 h (desarrollo del esbozo macronuclear) y 10 h (exconjugantes y degradación del viejo macronúcleo), respectivamente. Igualmente, el gen *TtGSTM17* tiene un pico de mayor expresión (aunque con valores muy inferiores) hacia las 4 h de iniciada la conjugación, de manera similar al gen *TtGSTM46* (Figura 97C).

De todos los 63 posibles genes *GSTs* que presenta el ciliado *T. thermophila*, en muchos de ellos se ha detectado su expresión en diferentes genotecas bajo diferentes condiciones, pero no en todos se ha detectado expresión, lo cual podría ser debido a que no se ha ensayado las condiciones adecuadas para su inducción o se trata de *pseudogenes*. Por ejemplo, en el genoma humano aparecen 6 *pseudogenes* que no se expresan, al menos en las condiciones ensayadas (Nebert and Vasiliou, 2004). Para dilucidar este punto habría que llevar a cabo un más extenso análisis de la expresión de todos ellos, teniendo en cuenta el inconveniente o dificultad de la aparición de múltiples genes con secuencias nucleotídicas idénticas, y por lo tanto imposible de distinguir por RT-PCR cuantitativa.

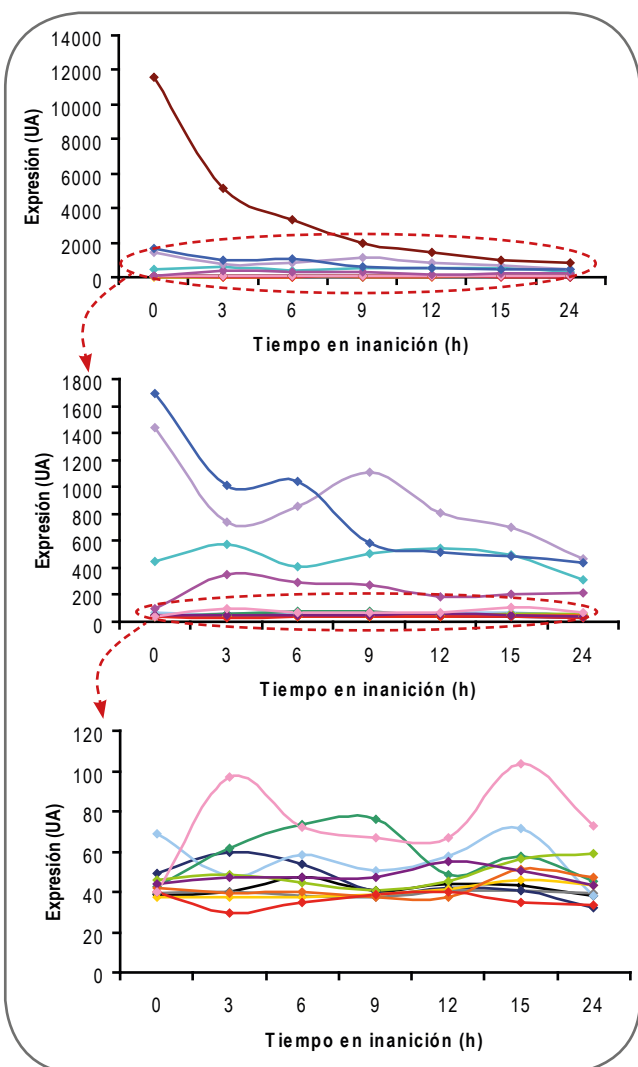
En el presente trabajo, se han estudiado un total de 16 genes *GSTs* individuales (~25% del total) más 2 grupos génicos (de 3 genes cada uno) imposibles de distinguir entre sí por sus elevadas homologías, por lo que los niveles de expresión obtenidos de estas agrupaciones podrían interpretarse como la suma de cada gen, o sólo de uno o dos genes del grupo. A partir de este punto, vamos a discutir los resultados de expresión de cada uno de ellos, comparándolo (cuando se pueda) con los resultados obtenidos en diferentes genotecas (Tabla 23) y los obtenidos del análisis de la micro-matriz (*microarray*) (Miao et al., 2009) (Figuras 97, 98, 99, 100 y 101).

Discusión

A



B



C

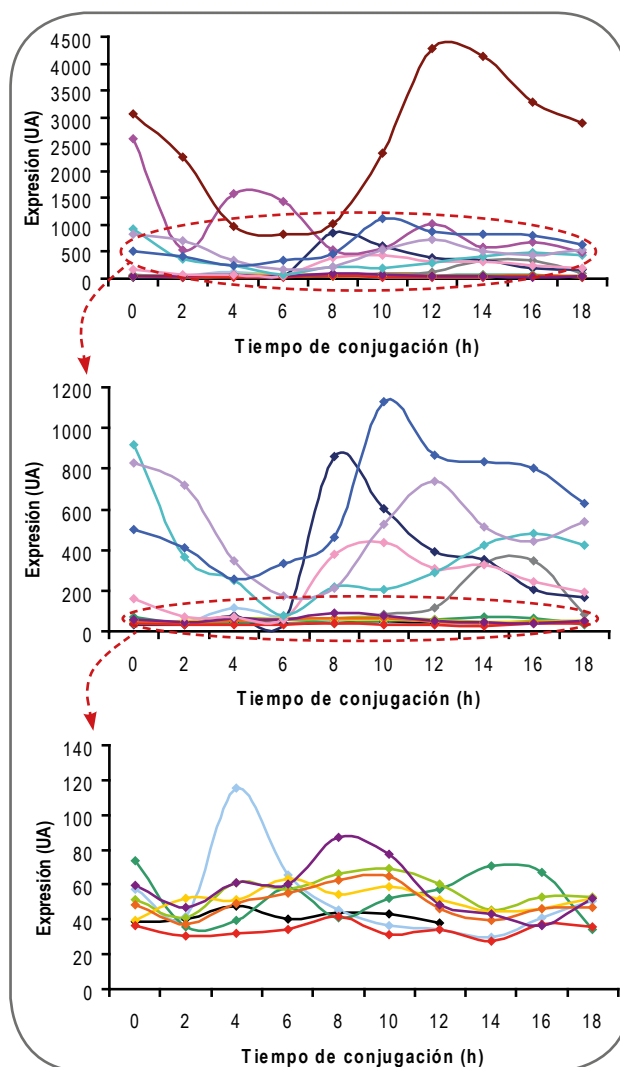


Figura 97. Niveles de expresión (unidades arbitrarias) de los genes *GSTs* de clase Mu que se han seleccionado en nuestro estudio de expresión y que, igualmente, se expresan en diferentes condiciones utilizando un *microarray* (Miao *et al.*, 2009). A: tres fases (con número de células creciente) del ciclo crecimiento-división. B: a diferentes tiempos de inanición (0-24 h) y C: en diferentes fases de la conjugación (0-18h). UA : unidades arbitrarias. Se representan gráficas en diferentes escalas.

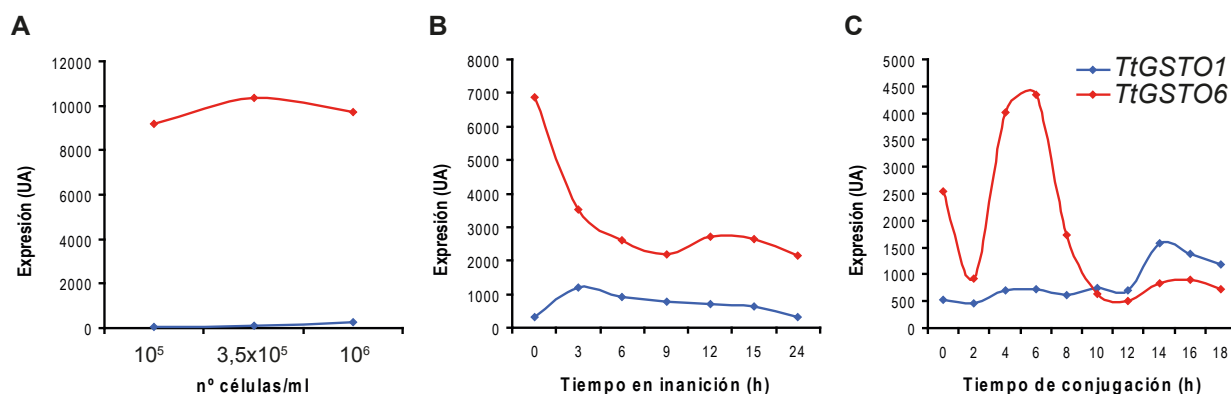


Figura 98. Niveles de expresión (unidades arbitrarias) de los genes GSTs de clase Omega que se han seleccionado en nuestro estudio de expresión y que, igualmente, se expresan en diferentes condiciones utilizando un *microarray* (Miao *et al.*, 2009). A: tres fases (con número de células creciente) del ciclo crecimiento-división. B: a diferentes tiempos de inanición (0-24 h) y C: en diferentes fases de la conjugación (0-18 h). UA : unidades arbitrarias.

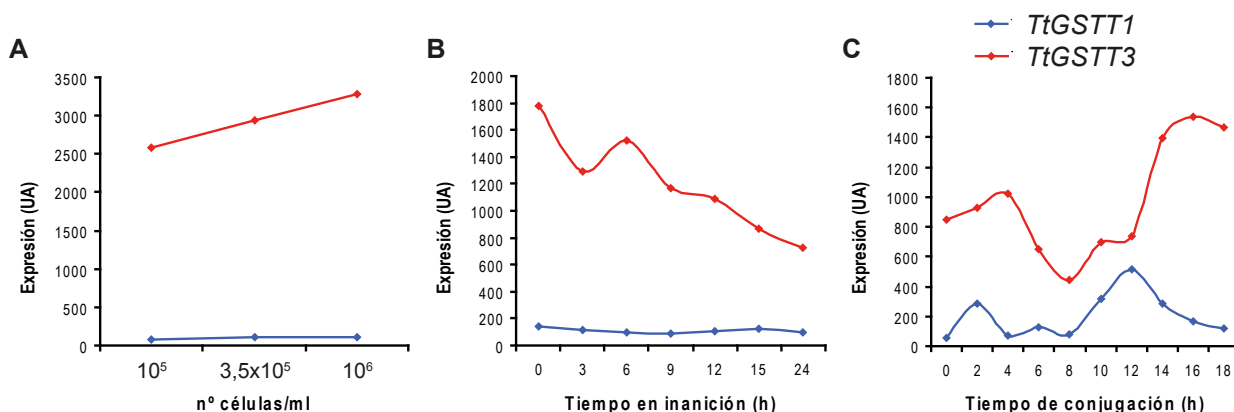


Figura 99. Niveles de expresión (unidades arbitrarias) de los genes GSTs de clase Theta que se han seleccionado en nuestro estudio de expresión y que, igualmente, se expresan en diferentes condiciones utilizando un *microarray* (Miao *et al.*, 2009). A: tres fases (con número de células creciente) del ciclo crecimiento-división. B: a diferentes tiempos de inanición (0-24 h) y C: en diferentes fases de la conjugación (0-18 h). UA : unidades arbitrarias.

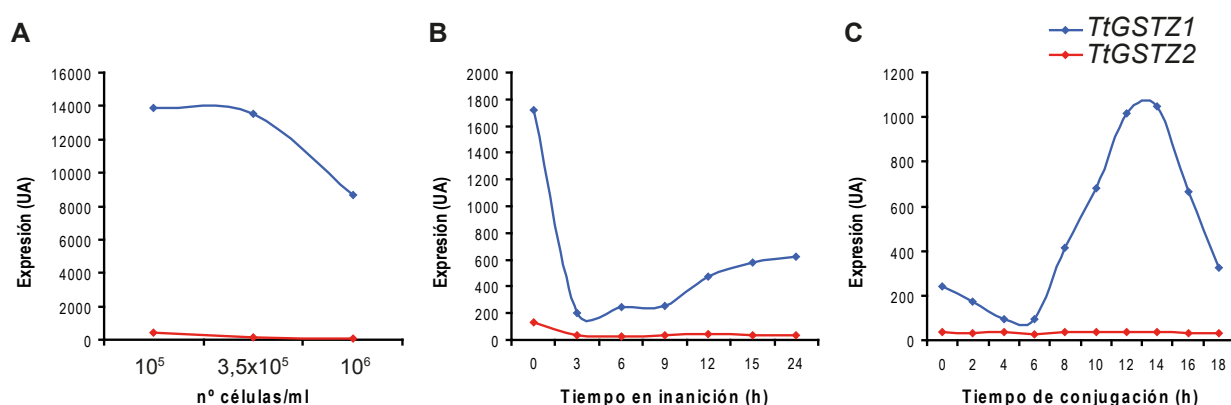


Figura 100. Niveles de expresión (unidades arbitrarias) de los genes GSTs de clase Zeta que se han seleccionado en nuestro estudio de expresión y que, igualmente, se expresan en diferentes condiciones utilizando un *microarray* (Miao *et al.*, 2009). A: tres fases (con número de células creciente) del ciclo crecimiento-división. B: a diferentes tiempos de inanición (0-24 h) y C: en diferentes fases de la conjugación (0-18 h). UA : unidades arbitrarias.

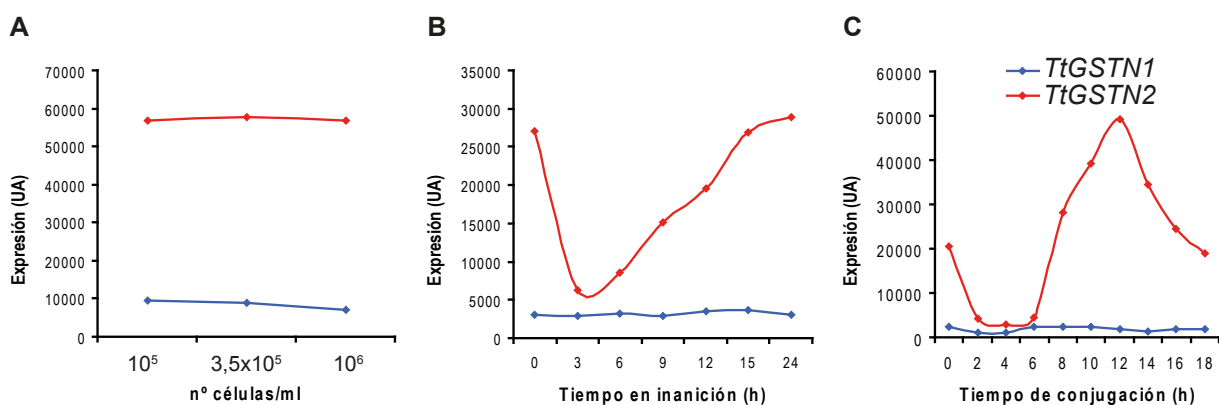


Figura 101. Niveles de expresión (unidades arbitrarias) de los genes GSTs específicos de *T. thermophila* (no asignados a ninguna clase conocida) que se han seleccionado en nuestro estudio de expresión y que, igualmente, se expresan en diferentes condiciones utilizando un *microarray* (Miao *et al.*, 2009). A: tres fases (con número de células creciente) del ciclo crecimiento-división. B: a diferentes tiempos de inanición (0-24 h) y C: en diferentes fases de la conjugación (0-18 h). UA : unidades arbitrarias.

4.5 Expresión de genes GSTs analizada individualmente.

La expresión de la mayoría de los 16 genes, que se han analizado individualmente, se induce por más de un agente inductor, a excepción de 3 de ellos que o se inducen exclusivamente por el sustrato o inductor de GSTs (CDNB), como son los genes *TtGSTM15* y *TtGSTM47*, o sencillamente no se inducen con los agentes o bajo las condiciones ensayadas, como es el caso del gen *TtGSTM40* el único de todos los analizados que presenta niveles de expresión relativa muy bajos (< 2), incluyendo la que se obtiene con el propio sustrato (CDNB), la cual es negativa. El gen *TtGSTM40* está cercano (~ 1.000 pb) al gen *TtGSTM44* en el mismo cromosoma (Figura 50), con el que tiene una homología nucleotídica del 92 % (Figura 53). Por consiguiente, si realmente el gen *TtGSTM40* no se expresa en ninguna circunstancia podría tratarse de un pseudogen que podría haber sido reemplazado por la isoforma génica *TtGSTM44* (originada probablemente por duplicación génica), la cual se expresa como se refleja en algunas genotecas, sobre todo la de inanición (3 clones) (Tabla 23). No obstante, el valor de ciclo umbral (Ct) de este gen es menor (entre los ciclos 23 y 25) respecto de aquellos del resto de los genes *TtGSTs* analizados (entre los ciclos 27 y 30), lo que significa que existe unas 16 a 32 veces ($2^{-\Delta Ct}$) más transcritos, a nivel basal, del gen *TtGSTM40* respecto del resto de los genes *TtGSTs* analizados. Por lo tanto, este gen se expresa a nivel basal aunque no se induce significativamente (valores < 2) bajo el efecto de los agentes estresantes utilizados. Es más, la mayoría de los tratamientos (24 h) con metales y otros agentes inhiben o disminuyen (valores negativos) la expresión basal de este gen (Figura 61A).

Igualmente, nuestros resultados de expresión del gen *TtGSTM40*, sin expresión significativa tras los tratamientos de estrés utilizados, son muy diferentes a los valores de expresión obtenidos por hibridación con la micromatriz (Miao *et al.*, 2009), durante el crecimiento y la conjugación, ya que como se aprecia en la Figura 97A y 97C, los valores de expresión durante estos procesos del ciclo de vida de *T. thermophila* son los máximos en comparación con otros genes *GST* de la clase Mu. Por el contrario, el estrés por inanición hace que los niveles de expresión de este gen decaigan paulatinamente a medida que se prolonga dicho estrés (Figura 97B), lo cual estaría en consonancia con los datos negativos (por debajo de los niveles basales en condiciones de crecimiento) obtenidos del análisis por RT-PCR cuantitativa de este gen tras inanición durante 24 h (Figura 61). Igualmente, según los resultados de Miao *et al.* (2009) con el *microarray*, estos dos genes (con 92 % de homología) se coexpresan (índice de coexpresión de 0,97) (Tabla 24), por lo que habría que tener en cuenta hasta que punto existe una hibridación cruzada ya que su homología es muy elevada. De manera similar, otras coexpresiones entre genes *GSTs* de clase Mu (Tabla 24) presentan unas homologías de secuencia nucleotídica muy elevadas, por lo que igualmente, la coexpresión pudiera deberse a un efecto de hibridación cruzada entre ellas. Además, en las genotecas analizadas por diferentes autores, el gen que aparece en varias de ellas es el *TtGSTM44* (estrés químico, metales pesados, inanición y crecimiento-división) (Tabla 23), mientras que el *TtGSTM40* no se ha detectado. En resumen, cabe la duda de que en el análisis con las micromatrices (Miao *et al.*, 2009) se haya detectado la expresión del *TtGSTM44* en lugar del *TtGSTM40*. Tras visitar la web (TGED) donde se exponen los resultados del *microarray*, no se encuentra ningún dato de expresión para el gen *TtGSTM44* (THERM-00602870), lo cual es contradictorio con los datos obtenidos en las genotecas de expresión de varios autores, en donde este gen (*TtGSTM44*) aparece en un total de 6 clones (Tabla 23). El máximo de clones registrados (3) se encuentran durante la conjugación, lo que coincide con el *microarray* para el gen identificado como *TtGSTM40*. Por otro lado, un índice de coexpresión del 0,97 nos indica que en el *microarray* no es posible diferenciar un gen del otro (Tabla 24)

Genes <i>GSTs</i> que co-expresan con otros genes <i>GSTs</i>	Índice de coexpresión	% de homología nucleotídica
<i>TtGSTM6</i> ↔ <i>TtGSTM7</i>	0,94	99
<i>TtGSTM22</i> ↔ <i>TtGSTM24</i>	0,98	96
<i>TtGSTM27</i> ↔ <i>TtGSTM29</i>	0,91	99
<i>TtGSTM40</i> ↔ <i>TtGSTM44</i>	0,97	92

Tabla 24. Valores de los índices de coexpresión de genes *GSTs* derivados del análisis con *microarray* (Miao *et al.*, 2009).

Con relación a los metales ensayados (Cd^{2+} , Cu^{2+} , As^{5+} , Pb^{2+} o Zn^{2+}), es el Cd^{2+} (24 h) junto con el As^{5+} (2 ó 24 h) los que inducen mayores niveles de expresión en los diferentes genes *GSTs* analizados. También son estos cationes inorgánicos los que inducen una mayor cantidad de genes *GSTs* de los analizados; 9 y 10 genes *GSTs*, respectivamente (Tabla 25). El ranking de valores de inducción relativa tras 24 h de exposición al Cd^{2+} es; *TtGSTZ2* >> *TtGSTM4* > *TtGSTO1* > *TtGSTT3* > *TtGSTM3* > *TtGSTO6* > *TtGSTT1* > *TtGSTM17* > *TtGSTM46*, no existiendo inducción significativa para el resto de los genes *GSTs* individualmente analizados (Tabla 25). A las 2 h de tratamiento se expresan 5 genes *GSTs*, los cuales también se expresan tras exposición prolongada al Cd^{2+} . En ambas situaciones el gen *TtGSTZ2* es el que alcanza mayores niveles de expresión posicionándose en el número uno en el ranking (Tabla 25). La levadura *Schizosaccharomyces pombe* tiene 3 genes *GSTs* (I, II y III) y el Cd^{2+} induce la expresión de los genes *GSTI* y *GSTIII*, estando la expresión del último regulada por metal por lo que se piensa que la proteína *GSTIII* podría estar involucrada en la detoxificación de metales (también es inducida su expresión por Hg, Al, Zn o Cu) (Shin *et al.*, 2002). Igualmente, en el pez globo *Takifugu obscurus* se han analizado la expresión de 7 genes *GSTs* en presencia de Cd (96 h), y los resultados reflejan que 5 de ellos (clases Mu, Omega, Zeta, Theta y MAPEG) se inducen a las 6 h de exposición, indicando su elevada sensibilidad a este metal (Kim *et al.*, 2010). En el copépodo marino *Tigriopus japonicus* un estudio por RT-PCR cuantitativa de la expresión de varios genes *GSTs* bajo el efecto del Cd, revela que un gen *GST* de clase Sigma es el que muestra mayores valores de inducción, obteniéndose la máxima expresión a las 12 h de exposición (Lee *et al.*, 2008). Mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* con deleciones en genes *GSTs* (*GTT1* o *GTT2*) han mostrado una absorción de Cd doble respecto del control. Los autores (Adamis *et al.*, 2004) sugieren que la formación de complejos GSH-Cd es dependiente de la actividad GST, y verifican que ambos genes juegan funciones diferentes en el mecanismo de detoxificación del Cd. En hongos de micorrizas arbusculares responden al estrés por metales (incluyendo el Cd) induciendo la expresión de genes *GSTs* (Hildebrandt *et al.*, 2007). Estos son algunos ejemplos de que el estrés tóxico producido por el metal Cd, es uno de los que más inducen la expresión de genes *GSTs* en diferentes organismos.

El segundo metal, de los utilizados, que más induce la expresión de los genes *GSTs* seleccionados de *T. thermophila* es el As^{5+} . El ranking de valores de inducción relativa aproximado es; *TtGSTO6* > *TtGSTO1* > *TtGSTZ2* > *TtGSTT3* > *TtGSTM46* > *TtGSTM3* > *TtGSTT1* > *TtGSTM4* > *TtGSTM17* > *TtGSTZ1* (tratamiento con As^{5+} durante 2 h) (Tabla 25). En una exposición prolongada (24 h), de nuevo son los genes *GSTs* de clase Omega (*TtGSTO1* y *TtGSTO6*) los que más se expresan (Tabla 25). Por lo tanto, los dos primeros en el ranking de inducibilidad con As^{5+} son dos genes *GSTs* de la clase Omega, tanto a las 2 h como a las 24 h de tratamiento con este metaloide.

Tratamiento	Ranking de valores de inducción relativa
Cd ²⁺ (2 h)	TtGSTZ2 >> TtGSTO1 ≈ TtGSTO6 > TtGSTT3 > TtGSTT1
Cd ²⁺ (24 h)	TtGSTZ2 >> TtGSTM4 > TtGSTO1 > TtGSTT3 > TtGSTM3 > TtGSTO6 > TtGSTT1 > TtGSTM17 > TtGSTM46
As ⁵⁺ (2 h)	TtGSTO6 > TtGSTO1 > TtGSTZ2 > TtGSTT3 > TtGSTM46 > TtGSTM3 > TtGSTT1 > TtGSTM4 > TtGSTM17 > TtGSTZ1
As ⁵⁺ (24 h)	TtGSTO1 > TtGSTO6 > TtGSTM46 > TtGSTT1 ≈ TtGSTM3 > TtGSTM4 ≈ TtGSTN1 > TtGSTT3
Pb ²⁺ (2 h)	TtGSTO1 > TtGSTT1 > TtGSTT3
Pb ²⁺ (24 h)	TtGSTO1 > TtGSTN1 > TtGSTT3 ≈ TtGSTO6 ≈ TtGSTM17 ≈ TtGSTT1 ≈ TtGSTZ1
Cu ²⁺ (2 h)	TtGSTZ2 > TtGSTN2 > TtGSTM3 > TtGSTM4
Cu ²⁺ (24 h)	TtGSTN2 > TtGSTM3 > TtGSTM4
Zn ²⁺ (2 ó 24 h)	TtGSTM9 > TtGSTM17 > TtGSTZ2 > TtGSTO6 > TtGSTT1 ≈ TtGSTT3 ≈ TtGSTN2
PQ (24 h)	TtGSTM9 >> TtGSTZ2 > TtGSTO1 ≈ TtGSTO6 ≈ TtGSTT3
MD (2 h)	TtGSTM3 ≈ TtGSTM46 ≈ TtGSTO1 ≈ TtGSTN1
CDNB (2 h)	TtGSTO6 > TtGSTN1 ≈ TtGSTN2 > TtGSTM46 > TtGSTM47 > TtGSTZ2 > TtGSTO1 > TtGSTM9 > TtGSTT1 > TtGSTT3 > TtGSTZ1 > TtGSTM4 > TtGSTM17 > TtGSTM3 ≈ TtGSTM15
pH 5 (24 h)	TtGSTM3 ≈ TtGSTZ2
pH 9 (24 h)	TtGSTM3
Inanición (24 h)	Todos negativos

(≈): Valor similar.

Tabla 25. Análisis comparativo de los niveles de expresión relativa de los diferentes genes GSTs analizados individualmente por RT-PCR cuantitativa, bajo el estrés originado por diferentes agentes estresantes. La presencia del mismo gen en cinco o más tratamientos se muestra con diferentes códigos de color.

Recientemente (Yin *et al.*, 2011), se ha comprobado, por primera vez en un protozoo ciliado, que *Tetrahymena* puede llevar a cabo biotransformación de arsénico (As⁵⁺) a monometilarseniato (MMA) y dimetilarseniato (DMA), al igual que la producción de arsénico volátil (aunque en pequeña proporción). Esto demuestra que este ciliado puede defenderse de la toxicidad de metales pesados no sólo biosintetizando metalotioneínas (Gutiérrez *et al.*, 2009), sino también por biometilación y biovolatilización del metal. La biotransformación de As⁵⁺ (arseniato) en mamíferos implica su reducción por la arseniato reductasa (purina nucleósido fosforilasa) hasta arsenito (As³⁺), el cual se metila por una arsenito metiltransferasa, siendo la S-adenosilmetionina el donador de metilo, y convirtiéndolo en metilarseniato (As⁵⁺). Posteriormente, este compuesto es reducido a ácido metilarsenioso (As³⁺) por la acción de una MMA(V) reductasa. De nuevo, este compuesto puede ser metilado por la arsenito metiltransferasa originando áci-

do dimetilarsénico (As^{5+}), el cual, igualmente, puede ser reducido por una DMA(V) reductasa hasta ácido dimetilarsenioso (As^{3+}). Tanto la forma mono- como dimetilada del arsénico (menos tóxica) puede expulsarse al exterior celular. La MMA(V) reductasa requiere GSH para su función catalítica (Aposhian *et al.*, 2004). Esta enzima se ha purificado a partir de tejido humano, y su secuenciación reveló un 92 % de identidad con una enzima GST (hGSTO-1) de la clase Omega (Aposhian *et al.*, 2004). Ratones *knockout* en *GSTO-1-1* (similar al gen *hGSTO-1*) mostraron un 20 % de actividad MMA(V) reductasa respecto del tipo silvestre, existiendo sólo cambios marginales en la sensibilidad al arsénico (Henderson and Wolf, 2011). Esto indica que probablemente existan otras enzimas GSTs de clase Omega implicadas en esta etapa de la biotransformación del arsénico, sobre todo si existe un número elevado de isogenes GSTs de esta clase en un mismo organismo.

Pues bien, ya que *Tetrahymena* puede biotransformar el arsénico a MMA(V) o DMA(V) (Yin *et al.*, 2011), muy probablemente lo haga de una forma similar al proceso conocido en mamíferos, de hecho presenta (tras su búsqueda en el genoma-macronuclear) las principales enzimas involucradas en la ruta de biotransformación de arsénico, a saber; una arseniato reductasa o purina nucleósido fosforilasa (TTHERM_00794530), que realiza la reducción $As^{5+} \rightarrow As^{3+}$. Varios homólogos a arsenito /MMA(III) metiltransferasa dependiente de SAM (S-adenosilmetionina) los cuales presentan dominios metiltransferasa-11, 12 y 18 (entre ellos el gen TTHERM_00616270), al igual que la arsenito metiltransferasa humana, lo que les hace buenos candidatos para llevar a cabo una función similar. Y, por último, GSTs de clase Omega (7 isoformas) las cuales podrían actuar como MMA(V) reductasas, de hecho en el ranking de inducibilidad de genes GSTs por arsénico (As^{5+}) (Tabla 25), los dos primeros (de los analizados) son GSTs de clase Omega (*TtGSTO6* y *TtGSTO1*).

Independientemente de esto, *T. thermophila* tiene una arsenito ATPasa de membrana (TTHERM_00471960), que podría bombear arsénico del citoplasma al medio extracelular como un elemento adicional en el mecanismo de resistencia al arsénico.

En una genoteca de expresión obtenida en nuestro grupo (datos sin publicar), a partir de poblaciones de *T. thermophila* tratada con As^{5+} (1 h), se ha detectado la presencia de dos genes GSTs (*TtGSTM23* y *TtGSTM32*). De los cuales, el *TtGSTM23* también aparece de manera significativa (0,3 %) en genotecas de metales pesados (Cd^{2+} ó Cu^{2+}) de otros autores (Coyne, R.S., datos no publicados) y conjugación (0,03 %) (Turkewitz, A.P., datos no publicados) (Tabla 23). Estos dos genes no se han seleccionado para su estudio individual por RT-PCR cuantitativa ya que tienen un 99 % de homología nucleotídica con el *TtGSTM22* ó un 96 % con el *TtGSTM24* (Figura 53), y de igual manera, el *TtGSTM32* tiene un 99 % con el *TtGSTM31* o un 95 % de homología nucleo-

tídica con *TtGSTM30* (Figura 53). Por lo tanto, en ambos casos es imposible diseñar cebadores para RT-PCR cuantitativa que los diferencie.

En el copépodo *Tigriopus japonicus* (Lee *et al.*, 2008), un gen *GST* de clase Sigma se induce significativamente en presencia de As^{3+} (2-6 mg/L), y su nivel de expresión se incrementa linealmente con el tiempo de exposición (1-96 h). De todo ello, se deduce que no sólo son necesarios genes *GSTs* de clase Omega para actuar en la biotransformación del As, sino que otros genes *GSTs* de clases diferentes podrían estar involucrados en la detoxificación de este metal pesado.

El Pb^{2+} (tratamiento 24 h) es el tercer metal pesado con mayores valores de inducción entre los genes *GSTs* individuales analizados, con un ranking de valores de inducción relativa; *TtGSTO1* > *TtGSTN1* > *TtGSTT3* \approx *TtGSTO6* \approx *TtGSTM17* \approx *TtGSTT1* \approx *TtGSTZ1*, el resto de los genes presentan valores no significativos respecto del control. A las 2 h de exposición es, igualmente, el gen *TtGSTO1* el que un mayor número de se expresa (Tabla 25). Tanto el Cu^{2+} como el Zn^{2+} (metales esenciales menos tóxicos) inducen la expresión de estos genes considerablemente menos que el resto de los metal(oid)es utilizados. Existe inducción significativa con Cu^{2+} (2 h) en los genes *TtGSTZ2* > *TtGSTN2* > *TtGSTM3* > *TtGSTM4*, y sólo en tres genes tras tratamiento prolongado (24 h) (Tabla 25). Igualmente, existe inducción significativa con el Zn^{2+} (2 ó 24 h) en los genes *TtGSTM9* > *TtGSTM17* > *TtGSTZ2* > *TtGSTO6* > *TtGSTT1* \approx *TtGSTT3* \approx *TtGSTN2* (Tabla 25). El Cu (0,5-2 mg/L) induce la expresión de un gen *GST* de clase Sigma en *T. japonicus*, y los valores de inducción se incrementan con el tiempo (1-96 h) (Lee *et al.*, 2008). La expresión de un gen *GST* (de clase no especificada) se induce significativamente en presencia de Cu en el hongo *Glomus intraradices*, que establece simbiosis con raíces de plantas (Hildebrandt *et al.*, 2007).

De este análisis comparativo entre los genes *GSTs* analizados individualmente podemos concluir que, independientemente del tipo de metal utilizado, el gen *TtGSTZ2* es el que con más metales y con mayores niveles se expresa (Tabla 25). Con menores niveles de expresión, pero inducibles por el mismo número de diferentes metales están los genes *TtGSTT3* y *TtGSTO6*. Igualmente, el gen *TtGSTO1* está entre los que se expresan más con metales no esenciales y, por lo tanto, más tóxicos (Tabla 25).

En la genoteca de expresión con metales (Coyne, R.S., datos no publicados) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene>) el autor utiliza Cd ($CdCl_2$) a 11 mM (1h) ó Cu ($CuSO_4$) a 500 mM (1 h), pero de la lista de ADNC presentada en el web el autor no diferencia entre los derivados del tratamiento con Cd o Cu, por lo que el análisis comparativo está limitado a la idea general "tratamiento con metales" sin poder especificar de cuál de ellos se trata, además de las

diferencias en las condiciones de tratamiento. En la Tabla 23, se muestra que el tratamiento con metales (Cd ó Cu) induce, al menos, 5 genes *GSTs*, siendo el *TtGSTM23* el que más veces aparece. En nuestro trabajo no hemos utilizado este gen, ya que presenta un 99 % de homología nucleotídica con el *TtGSTM22*, por lo que no es posible diseñar cebadores para poder distinguirlos por RT-PCR cuantitativa. Si el número de clones obtenidos refleja los niveles de expresión, el ranking sería; *TtGSTM23* >> *TtGSTM11* > *TtGSTM15* \approx *TtGSTM44* \approx *TtGSTN1* (Tabla 23), de los cuales sólo el *TtGSTN1* y el *TtGSTM15* han sido analizados, en este trabajo, como genes individuales. Según los datos obtenidos (Tabla 25), *TtGSTN1* se expresa con Pb (24 h) pero prácticamente nada con Cd (24 h) ó Cu (2 h), lo que podría coincidir con los bajos niveles obtenidos por Coyne (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene>) (0,03 % del total de clones analizados), sin considerar las importantes diferencias entre las concentraciones y tiempos de tratamientos utilizados. El gen *TtGSTM15* es uno de los que sólo se expresa con el inductor o sustrato universal de *GSTs* (Tabla 25), no obstante según las genotecas de expresión obtenidas por Turkewitz, este gen aparece también durante la conjugación e inanición (1-6 h) de *T. thermophila* (Tabla 23). Con respecto a la inanición hay que destacar la diferencia de tratamientos; un máximo de 6 h (genoteca de expresión) respecto de los datos obtenidos a las 24 h (RT-PCR cuantitativa), lo que podría explicar las diferencias obtenidas, como es el caso del *TtGSTN1* que se ha detectado (0,03%) en la genoteca de inanición, pero que no se expresa a las 24 h de inanición como muestran nuestros resultados (Tablas 23 y 25). Igualmente, existen resultados contradictorios respecto del gen *TtGSTN2* entre los mostrados en la genoteca de inanición (Turkewitz, A.P., datos no publicados) en la que no se detectan clones para este gen (Tabla 23), con respecto a los obtenidos en el *microarray* (Miao *et al.*, 2009) (Figura 101B), en donde la expresión del gen incrementa paulatinamente hasta alcanzar un máximo a las 24 h, y los nuestros (RT-PCR cuantitativo), en donde tampoco se detecta una expresión significativa (Tabla 25).

El estrés oxidativo originado por PQ (24 h) o MD (2 h) induce la expresión de algunos de los genes *GSTs* que hemos analizado individualmente (Tabla 25). Entre ellos, cabe destacar el gen *TtGSTO1* que responde a ambos compuestos y el gen *TtGSTM9* que es el que alcanza mayores niveles de inducción (Figura 59C) respecto del resto de genes analizados (Tabla 25). Ambos genes *GSTs* de la clase Omega analizados (*TtGSTO1* y *TtGSTO6*) responden de forma similar al PQ (Tabla 25). El *TtGSTO6* presenta niveles de expresión constante durante el crecimiento, baja sus niveles de expresión durante la inanición y tiene un pico de expresión hacia las 4-6 h del proceso de conjugación (Figura 98), según los datos del *microarray* (Miao *et al.*, 2009).

Un ratón *knockout* en un gen *GST* de la clase Alpha (*mGSTA4-4*) presenta una mayor sensibilidad al PQ (Henderson and Wolf, 2011), indicando su importancia en la respuesta celular al

estrés oxidativo provocado por este compuesto. En el copépodo marino *Tigriopus japonicus* un gen *GST* de la clase Sigma es el que mayores niveles de expresión alcanza tras un tratamiento con H_2O_2 , alcanzando un máximo hacia las 48 h (Lee *et al.*, 2008).

La MD (menadiona ó 2-metil-1,4-naftoquinona = Vitamina K_3) ha sido ampliamente utilizada en estudios sobre daño oxidativo. La MD y otras quinonas pueden reducirse por uno o dos electrones. Una reducción por un electrón origina la formación de radicales de semiquinonas, los cuales son muy inestables y reaccionan rápidamente con el oxígeno originando ROS. Si son reducidas por dos electrones originan hidroquinonas, lo cual está catalizado por la enzima DT-diaforasa (NAD(P)H-quinona oxidoreductasa 1; EC 1.6.99.2), y sin la formación de intermediarios inestables y productores de ROS. Un análisis de células resistentes a MD (células K300) respecto de las sensibles (células P19) (Chiou and Tzeng, 2000) ha revelado que la adquisición de resistencia está asociada con un elevado contenido en GSH y una elevada actividad enzimática DT-diaforasa. En las células resistentes K300 la actividad enzimática de GST era inferior a aquella correspondiente en células (P19) sensibles a la MD, indicando la necesidad de estas enzimas para responder al estrés oxidativo.

El protozoo ciliado *Blepharisma japonicum* tiene dos GSTs (86 % de identidad) específicas de especie cuya expresión es inducida por luz (Takada and Matsuoka, 2008), indicando, igualmente, su relevancia en contrarrestar el estrés fotooxidativo.

Las GSTs de clase Omega, como TtGSTO1 (Figura 90B), tienen residuos de cisteína en la proximidad del centro catalítico, que pueden formar enlaces disulfuro con el GSH, por lo que estas enzimas podrían tener actividad oxidoreductasa y dehidroascorbato reductasa dependiente de GSH, reflejando su similitud estructural con glutaredoxinas. En *Caenorhabditis elegans* (Burmeister *et al.*, 2008) se ha analizado la función de una GST de clase Omega (GSTO-1) sobreexpresando en un transgénico el gen *GSTO-1*, lo que originó un incremento de la resistencia al estrés oxidativo inducido por PQ. Igualmente, un bloqueo específico del mismo gen (usando ARNi) puso de manifiesto un incremento de la sensibilidad al PQ entre otros agentes estresantes (arsenito, choque térmico) (Burmeister *et al.*, 2008).

Respecto de la inducción de la expresión de genes *GSTs* por el sustrato e inductor universal (CDNB) (Tabla 25), todos son inducibles en mayor o menor grado, excepto el *TtGSTM40*. Los dos genes *GSTs* específicos de *T. thermophila* (*TtGSTN1* y *TtGSTN2*) responden por igual al sustrato CDBN y a un nivel relativamente alto (2º puesto en el ranking de los genes analizados) (Tabla 25), lo que corrobora su naturaleza GST.

En cuanto al pH, sólo dos de los 16 genes testados han respondido significativamente al pH (Tabla 25). Entre ellos es el *TtGSTM3* el que se expresa en ambos casos (pH ácido y básico), con un valor superior para el pH ácido que para el básico. Este mismo gen aparece en la genoteca de conjugación (0,009 %) (Tabla 23), al igual que se expresa bajo otros agentes estresantes, tales como; MD, Cu^{2+} , As^{5+} y Cd^{2+} (Tabla 25). El pH óptimo para la actividad catalítica de las enzimas GSTs está en torno a la neutralidad. Un estudio realizado en el camarón o gamba blanca *Litopenaeus vannamei* constituye uno de los pocos casos en que se ha analizado la expresión de un gen GST de la clase Mu (*LvGSTM*) bajo estrés de pH (Zhou et al., 2009). La expresión del gen *LvGSTM* aislada del hepatopaneas incrementó significativamente respecto del control, tras exposición 12 h a pH 5,6. Aunque el pH óptimo de la enzima *LvGSTM* está cerca de la neutralidad, la actividad GST global en este tejido incrementó igualmente a pH ácido (Zhou et al., 2009). Ambos incrementos (expresión de *LvGSTM*) y actividad global GST probablemente mitigan los efectos tóxicos de la acidosis y/o neutralizan la toxicidad de los radicales libres (ROS) generados por el tratamiento a pH ácido (aunque este último es un proceso poco entendido). Igualmente, genes que codifican enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) son sobre-expresados bajo estrés por pH ácido (Zhou et al., 2009). La expresión del mismo gen *LvGSTM* a pH 9,3 no presenta un incremento significativo respecto del control (Zhou et al., 2009).

4.6 Expresión de genes GSTs analizada en grupo.

A pesar de la imposibilidad para diferenciar por RT-PCR cuantitativo determinados genes GSTs debido a su elevada homología nucleotídica, nos ha parecido interesante llevar a cabo un análisis de expresión de algunos grupos, aunque no podamos discriminar si los niveles de expresión se deben a sólo uno de ellos o a más de uno, siendo en este caso la suma de varias expresiones. Ambos grupos analizados constan de genes GST de la clase Mu (Figuras 60C y 61B). El primer grupo analizado consta de tres genes (*TtGSTM27/TtGSTM28/TtGSTM29*) que tienen ~99-100 % de homología nucleotídica entre ellos (Figura 53), y están cercanos en el cromosoma formando un grupo (Figura 50). Los niveles de expresión alcanzados presentan valores más elevados que el promedio de los genes GSTs analizados individualmente, lo que podría corroborar la expresión conjunta o suma de más de uno o de los tres juntos. Así por ejemplo, el tratamiento con Cd^{2+} (24 h) alcanza los valores más elevados de inducción relativa entre todos los analizados. Algo similar ocurre con el sustrato e inductor de GSTs (CDNB) (2 h) (Figura 60C). Este grupo presenta inducción significativa tras tratamiento con metales (Cd^{2+} , Cu^{2+} , As^{5+} , Pb^{2+} y Zn^{2+}) y pH 9, aunque no parece inducirse ninguno de ellos en presencia de PQ o MD, pH 5 o

TtGSTM27 5' ATA-----TTAT----TTA---TAAATTATTCA---AA-CAGTTTTCCTTCATTTTAAATATCAAATATTATATAA
TtGSTM28 5' GTAATTAATAAAATTTTTCATTTATTTAAATATTATATAGAAAATCAGTTTTCCTTT---TTTTTAATATTAAATATTCTATAA
TtGSTM29 5' -TA-----TT-----TTA---AAAATAATTTTAGAAAATAACTTTACTTCATTATATAAGTATTAAATATTTTATAG

TtGSTM27 TGGACAGATGAATGGAATAATAATTTGATTCATTATGAAAACCTGATTGTAAAAATAA-ATATTAATAATTAATAAAATTTGT
TtGSTM28 TGGATGGAT-----TTACTGAGTGATTATTATTATGAAAACCTGGTTTTAAAAATAAAGTATTAAAAATTAATAAAATTTGT
TtGSTM29 TGGATCTAAAAATGAATGGATGATTGATTCATTGTGAAAACCTGGTTATAAAAAATAG-GTATTAAAAATTAATAAAATTTGT

TtGSTM27 AAAAAATCAAATAGTAAATTTTAAAAATCAACAATGATTTTTCGAAAAATTTAATTTATCTATTTTCATTGAGGATAAAAATC
TtGSTM28 AAAAAATCAAATAGTAAATTTT---AATCAACAATGATTTTTCGAAA-AATTAAATTTATCTATTTTCAT-AAGGACAAAATC
TtGSTM29 AAAAAATCAAATAGTAAATTTT---AATTAACAATTAATTTTTCGAAA-AACTTAATTTATCTATTTCCAT-AAAGATAGAACT

TtGSTM27 AAATTTAACA-AATAGAACAAATAAAGAAAATTTCCAACAAAATTAACAATCTAAACTTAATATTAAAGTTTGAATAA
TtGSTM28 AAATTTAAGAAAATAGAACAAATAAAGAAAATTTCCAACAAAATTAACAATCTATGACTTAACATTAAAGTTTATTAC--
TtGSTM29 AAATTTAACA AAAATAGAACAAATAGAGAAAATTCAGAACAAAATTAACAATCTAAGACTTAAATTAAGTTTGAAGCTT

TtGSTM27 AATGAGAAAATTATAAATTTGTAAAAATTTGGCTTATTTAAAAATTTTTTCTTATTTTTATCTAAAAATTCCTAAATCTAAA
TtGSTM28 AAAGAGAAAATTATGAATTTGTAA-AATTTAGCTTATTTAAAAATTTTATTCTTATTTTTATCTAAAAATTCCTAAATCTGAA
TtGSTM29 AATGAGAAAATTATGAATTTGTAAAAATTTGGCTTATTTAAAAATTTTTTCTTATTTTTATCTAAAAATTCCTAAATCTAAA

TtGSTM27 CAATTCGTATAAGCACGTTTTTTTTAAGAAAGTGTTTCAAAGCTATTTAAATATAATAATAAAAAATATAAAAAACATAAA-AT
TtGSTM28 TAATTCGACAAGATGTTTTTTTTAAGAAATTTATCAAAGCTT--ACAAAT--AAATATAA---AATAAAAAACATAAA-AA
TtGSTM29 TAATTCGACAAGCACGTTTTTTTTAAGAAAGTGTTTCAAAGCTATTTAAATATAATAAAAAAAATAATAAAAAACATAAAAA

TtGSTM27 AGAATATAAAGAAATAAAAAATAAATAATTCAGAAA-A 3'
TtGSTM28 AGAATATTATAAATAAAAAATATA-AATTCAGTAAAT 3'
TtGSTM29 AGAATATTAGAAGTAGAAAATATAAAATTCAAACAA-A 3'

Figura 102. Alineamiento de los primeros 500 pb de las regiones 5'UTR de los genes *TtGSTM27*, *TtGSTM28* y *TtGSTM29*. En amarillo se destacan los nucleótidos idénticos para los tres genes.

inanciación (24 h). Ninguno de estos genes se han detectado previamente en genotecas, e igualmente mantienen niveles bajos de expresión en las condiciones testadas en los *microarrays* (Miao *et al.*, 2009). El alineamiento de los primeros 500 pb (a partir del codón de inicio) de las regiones 5'UTRs de estos tres genes (Figura 102), muestra una elevada homología (~91-92 %), lo que hace pensar en la probabilidad de que la expresión de estos genes esté regulada por los mismos elementos.

El segundo grupo de genes analizados conjuntamente es el constituido por tres genes (*TtGSTM41/TtGSTM42/TtGSTM43*) que presentan ~96-97 % de homología nucleotídica entre ellos (Figura 53), e igualmente se encuentran cercanos en la misma región cromosómica (Figura 50). Su expresión conjunta viene también ratificada por los elevados niveles de inducción relativa obtenidos en algunos tratamientos (Figura 61B), probable fruto de la suma de expresiones de más de uno de ellos. Al igual que el grupo previo, este segundo grupo responde al Cd^{2+} (24 h) con elevados niveles de inducción (Figura 61B), aunque menores que aquel. También responde con una inducción significativa al Cu^{2+} , As^{5+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} , al igual que al sustrato e inductor CDNB.

Pero, a diferencia del grupo anterior (Figura 60C), este grupo responde al PQ significativamente y no responde al estrés por pH (Figura 61B). Al igual que en el grupo anterior, estos genes no se han detectado en genotecas y sus niveles de expresión son bajos en las condiciones

Discusión

```

TtGSTM41 5' TGAATATAAAATGATAAAACAAATATTA-TTTAATAATTAAATATATATATACTAA-ACAATCATAATCTTGAAGCGA
TtGSTM42 5' ---ATATAAAATTTGGTTATTTATGTAAA-TTTTATAATTA-TAAAAGCAACATTGA----TCAAAAT-TGC-----A
TtGSTM43 5' T-TATATGTGATT-TTTTTATTGTAAGATAATTTTATTATTTTGTAGATAGGATTATTACAAT-ATTTTTTTGAA----

TtGSTM41 ATCCAAAAT-TTTT-AATGCTGGCAA--ATTTTATGAATTAATTGTGTACTATAAATATG---AATGAAAATAGTGTA
TtGSTM42 ATACTTAAT-TATT-AATCTTAGATAT-ATCTTCTTTGATAACAATAAT---ATGAATAAGTATAGCTGATCTAAGGTAT
TtGSTM43 -AAGTAAATATATTAATCTGAAAGTGGTGTACGTGTT---TTTGAT---ATAAATTTGTGAATTAAATCTTGTTT

TtGSTM41 ATCATTAAGTTA-----CTT--TAA-TTTTTATTTTTGTAGTAACAAAAAATTAGAGAT-ATTAAATCTTATGA
TtGSTM42 AGCATAGCAATAGGT-----CTT--TTA-TTTTCTATTATTCTTA----CTATTATTTTATAACAATTATACTATTT-TA
TtGSTM43 GATATAGAAGAAATTAATTTGTTTACAAAATTATCACGCGG--AAAAATAGTAATTGATAAATAAATAAATTAA--TTA

TtGSTM41 ATTTGTGTT--TTTGATAGATTCTAATCTAATGCTTAACATA--TT-TGATTTTTTTCTTTTCTTCTACGAGAGAAGA
TtGSTM42 AATAGCTGT--ACTAATA--TT-T--TTTAAAGCTT---TTATTT-TAATTTATTTAG-ATTTAATTGTA--GAAGAAAG
TtGSTM43 ATTAGTACCTAGTTAACA--TT-T--ATTAT-CCATTATTCGTTTTTCATGCATTCAAT-ATATTC-----ATTCATTAAAA

TtGSTM41 TTGATCTAAATTAGAA---AGAAATTAA---TCTTAT-----AAAATCTAATTAAAAAAGTTA-GTATTGGCTGAAAAA
TtGSTM42 TTAACCAAAATTTGTTTTTCAACAAAGGATTTGATTAT-----TAGTCAAATAGTTATAGATTTG--TTAACTAGAAAA
TtGSTM43 TTGATTGAATTTGAAG---TCATAGAAA---TCTGAAAAAGAAAAAATCTGATTAACTCTCTATAGAGTTTGAA--T

TtGSTM41 ATTA--CTTTAAAAATCAAAATCATT--A-AATTAATCTAAA-ATT---GTATAAATAAAA-TTCAATTTTGTAATTTTA
TtGSTM42 ATAAATAATTAAATTTATAGATTAGTTATACATTCAGTCTTAAATATCTTTATTTATAAAC-CTTAATTTAATAAAAAA
TtGSTM43 GTAGCGAATATATCATATAAATA-TCT--AAAATAAATCATAA-ATA---TTATTGATAAAAGTTAAATT----ATTAA

TtGSTM41 CCACAAAAGACTT---AAC-AAAGCATAATAAGAAAAAAGATA-----TATAAAAAG--AAATA--AAGAA 3'
TtGSTM42 TTA-AATTGACTTTAAATCTAAAA-ACGAAAAATTGA-AAAAAGATAGCACAACTAATAACAAATT--ATTGA 3'
TtGSTM43 T---AAAATATA---AAC-AAAG-ACAATAAACTAA-TTGCAGATCTCTTTCGCAATTT---GAATAGATAGAA 3'

```

Figura 103. Alineamiento de los primeros 500 pb de las regiones 5'UTR de los genes *TtGSTM41*, *TtGSTM42* y *TtGSTM43*. En amarillo se destacan los nucleótidos idénticos para los tres genes.

ensayadas en los microarrays (Miao *et al.*, 2009). También, se ha llevado a cabo un alineamiento de los primeros 500 pb (respecto del codón de inicio) de las regiones 5'UTRs de estos tres genes (Figura 103), observándose un elevado nivel de homología (~ 58-59 %) aunque menor que lo observado en el grupo previo, por lo que igualmente también podrían presentar elementos comunes de regulación de la expresión.

4.7 Consideraciones finales sobre la expresión de los genes *GSTs* de *T. thermophila*.

En la Tabla 26 se resume de forma gráfica los patrones de inducción significativa para los diferentes tratamientos de los 16 genes *GSTs* cuyo análisis se ha llevado a cabo individualmente y los de los dos grupos de 3 genes parálogos cada uno (todos de la clase Mu).

De estos resultados globales se infieren los siguientes puntos:

1) La comparación entre patrones de expresión refleja cierto nivel de expresión diferencial entre algunos genes *GSTs*.

2) *TtGSTM3* y *TtGSTZ2* responden frente a un pH ácido y/o básico a diferencia del resto analizado.

3) Muchos de ellos (~56 %) responden frente a los metales pesados más tóxicos (como el Cd²⁺ y el As⁵⁺), mientras que frente a metales esenciales como el Cu²⁺ sólo responden 4 genes *GSTs* (~25 %) de los analizados.

Tratamiento	Genes TtGSTs													
	M3	M4	M9	M15	M17	M40	M46	M47	O1	O6	T1	T3	Z1	Z2
Cd ²⁺ (2 h)														
Cd ²⁺ (24 h)														
As ⁵⁺ (2h)														
As ⁵⁺ (24h)														
Pb ²⁺ (2 h)														
Pb ²⁺ (24 h)														
Cu ²⁺ (2 h)														
Cu ²⁺ (24 h)														
Zn ²⁺ (2 ó 24 h)														
PQ (24 h)														
MD (2 h)														
CDNB (2 h)														
pH 5 (24 h)														
pH 9 (24 h)														

Tabla 26. Análisis comparativo de los patrones de inducción para cada gen o grupo de genes GSTs, analizados por RT-PCR cuantitativo. GM(27/28/29): Grupo de genes TtGSTM27, M28 y M29. GM(41/42/43): Grupo de genes TtGSTM41, M42 y M43. Los cuadros sombreados indican expresión significativa respecto del control (sin tratamiento), para los diferentes agentes estresantes.

4) Muchos (~44 %) de los genes que responden a metales pesados responden además frente a estrés oxidativo originado por compuestos orgánicos (PQ o MD).

5) Los genes *GSTs* específicos de especie (*TtGSTN1* y *TtGSTN2*) junto con el *TtGSTM9* y *TtGSTZ1* son los que muestran una mayor especificidad y selectividad en su respuesta al estrés (sólo se inducen frente a tres o cuatro agentes o condiciones de estrés diferentes).

6) Mientras que el *TtGSTM3*, *TtGSTO1* y el *TtGSTZ2*, son los genes que muestran una respuesta estrés más amplia o frente a un mayor número de agentes o condiciones de estrés.

7) Hay genes *GSTs*, como *TtGSTM15*, *TtGSTM40* o *TtGSTM47*, que no responden a ninguno de los agentes o condiciones estrés utilizados en este análisis o sólo a su sustrato (CDNB). Sin embargo, según los resultados del *microarray* (Miao *et al.*, 2009) ambos genes se expresan durante el ciclo crecimiento-división y en el proceso de conjugación (Figura 97), por lo tanto podrían ser genes ligados al ciclo de vida normal del ciliado y no responder a estrés celular (al menos con los agentes estresantes utilizados).

8) Estos genes responden (con diferentes niveles de inducción) al sustrato e inductor de *GSTs* (CDNB), excepto el gen *TtGSTM40*. La afinidad por el sustrato CDBN varía para cada clase de *GST*, y algunas de las más “primitivas” *GSTs* (las más cercanas a la proteína ancestral) tienen muy poca o ninguna actividad con sustratos típicos de *GSTs* (como el CDBN), entre ellas las *GSTs* de clase Omega o Theta (Zimniak, 2007). Sin embargo, los genes seleccionados de *T. thermophila* de ambas clases (*TtGSTO1*, *TtGSTO6*, *TtGSTT1* y *TtGSTT3*) (Tabla 26, Figuras 62B y C, 63A y B) son considerablemente y significativamente inducibles por CDBN, independientemente de que pueda o no ser utilizado como sustrato para estas enzimas. Por lo tanto, parece ser que el carácter “sustrato de *GST*” e “inductor de la expresión de genes *GSTs*” podrían ser independientes.

La evolución de genes parálogos por duplicación y posterior divergencia es uno de los mecanismos más universales de creación de nuevos genes y la base del origen de muchas familias génicas. Recientemente (Sánchez-Pérez *et al.*, 2008), se ha introducido el concepto de ecoparálogo en procariotas a raíz del análisis del genoma de la bacteria hiperhalófila *Salinibacter ruber*. Ecoparálogos se puede aplicar a los genes con pocas diferencias en sus secuencias, que originarían proteínas similares, pero la expresión de cada gen parálogo responde a diferencias ecológicas o ambientales. El origen de estos genes ecoparálogos podría deberse a duplicación génica y subsiguiente divergencia. La redundancia génica se considera que confiere cierto grado de robustez al organismo, ya que puede mantener un fenotipo estable bajo cambios hereditarios y/o ambientales. La redundancia genética no sólo se da en procariotas, también existe en microorganismos eucariotas, siendo los ciliados un ejemplo paradigmático de este fenómeno

como se ha comprobado tras la secuenciación de los genomas macronucleares de *T. thermophila* (Eisen *et al.*, 2006) y *Paramecium tetraurelia* (Aury *et al.*, 2006). La redundancia génica puede explicarse como la consecuencia de alguno de los siguientes procesos selectivos: una elevada dosis proteica (dando origen a genes duplicados idénticos), diversificación de proteínas (dando origen a parálogos divergentes) y/o adaptación a cambios ambientales (dando origen a ecoparálogos de divergencia intermedia).

En la familia de genes *GSTs* de *T. thermophila* tenemos un buen ejemplo de redundancia génica y de posibles genes ecoparálogos. Así, por ejemplo; el par *TtGSTM3* y *TtGSTM4* (con 94 % de identidad en la secuencia aminoacídica) (Figura 53), y localizados en el mismo cromosoma (Figura 50) se expresan diferencialmente ante la acidificación o alcalinificación del medio (Tabla 26), o el par *TtGSTZ1* y *TtGSTZ2* (con 84 % de identidad) y localizados en el mismo brazo cromosómico (Figura 50), y que, igualmente, presentan patrones de expresión diferencial frente a diferentes agentes estresantes ambientales (como el PQ, el Zn^{2+} o el Cu^{2+}) (Tabla 26). Muy probablemente existan otros muchos ecoparálogos dentro de esta familia génica de *GSTs*, que responden diferencialmente a distintos factores ambientales (aún por descubrir), y mantienen una divergencia intermedia o baja (elevado % de identidad).

5. TIORREDOXINA REDUCTASAS (TrxRs) Y GLUTATIÓN REDUCTASA (GR) DE *Tetrahymena thermophila*.

La familia de piridina-nucleótido-disulfuro oxidoreductasas incluye enzimas tales como glutatión reductasa (GR), tripanotión reductasa (TryR), reductasa de cationes Hg^{2+} y tiorredoxina reductasas (TrxRs) procariotas y eucariotas. El denominado sistema tiorredoxina está constituido por la tiorredoxina (Trx), la TrxR y el NADPH (como fuente de poder reductor) (Powis and Montfort, 2001). En la Figura 104, se muestra un esquema de las reacciones redox catalizadas por el sistema tiorredoxina en mamíferos. La TrxR es la única enzima capaz de reducir el sitio activo de la Trx, que a su vez cataliza la reducción de enlaces disulfuro de muchas proteínas (Figura 104). La Trx tiene múltiples e importantes actividades biológicas, a saber: actúa como factor de crecimiento, tiene propiedades antioxidantes ya que es un eficiente donador de electrones tanto a la glutatión peroxidasas como a las tiorredoxina peroxidasas (las cuales reducen el H_2O_2). También la Trx es, una fuente de poder reductor para la ribonucleótido reductasa que cataliza la conversión de ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos (el primer paso en la síntesis del ADN, esencial en la proliferación celular), activa la unión con el ADN de numerosos factores de transcripción involucrados en la respuesta al estrés oxidativo (como el AP-1), la apoptosis y la génesis de tumores, y la forma reducida de la Trx promueve la unión entre proteínas (entre ellos

la homodimerización de la propia Trx) (Powis and Montfort, 2001). Las TrxRs son una diana para la quimioterapia del cáncer, ya que tanto los genes *TrxRs* como el de la Trx se sobre-expresan en muchos tumores agresivos y participan en la carcinogénesis y la resistencia a drogas. Muchas drogas usadas en clínica y agentes para la quimio-prevención del cáncer son inhibidores de TrxRs. Su inhibición bloquea la actividad mediada por la Trx en la síntesis del ADN y en la defensa contra el estrés oxidativo (Holmgren and Lu, 2010).

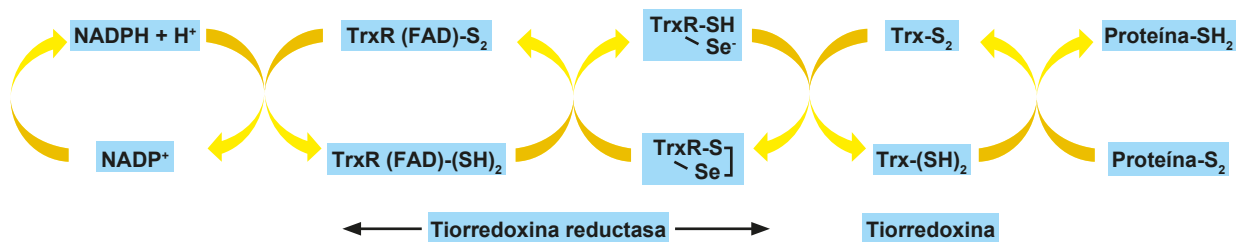


Figura 104. La fuente de poder reductor es el NADPH, el cual cede electrones a la FAD de la TrxR, luego al disulfuro de la región N-terminal de una de las subunidades de la TrxR, y finalmente al lugar activo C-terminal Gly-Cys-Sec-Gly de la otra subunidad de la TrxR. La Trx oxidada se reduce gracias a los electrones transferidos por la TrxR, la cual puede catalizar la reducción de enlaces disulfuro de muchas proteínas.

Existen dos formas de TrxR, que son estructuralmente diferentes (Williams *et al.*, 2000); las L-TrxRs (de baja masa molecular) y las H-TrxRs (de alta masa molecular), aunque ambos tipos realizan la misma actividad (reducir la Trx). Los microorganismos procariotas (bacterias y arqueas), muchos microorganismos eucariotas y las plantas presentan L-TrxRs (que no son selenoproteínas), mientras las H-TrxRs (algunas son selenoproteínas) se encuentran en los animales, algas verdes y algunos protozoos parásitos (phylum Apicomplexa) como *Plasmodium falciparum*. Algunos autores (Hirt *et al.*, 2002) creen que la presencia de una H-TrxR en este protozoo pueda ser consecuencia de un proceso de transferencia horizontal de genes entre el animal hospedador y el correspondiente parásito. La H-TrxR del mosquito *Anopheles gambiae* y la del protozoo parásito *P. falciparum* comparten un 45 % de identidad de secuencia (Bauer *et al.*, 2003). Igualmente, ambas no son selenoproteínas, sin embargo el extremo C-terminal y el segundo centro catalítico de ambas enzimas son distintos, y la disposición de las 2 Cys terminales es diferente. En el mosquito las dos cisteínas finales están contiguas según la secuencia TCCS, mientras que en estos protozoos parásitos las dos cisteínas están separadas por 4 aminoácidos (CXXXXC) que varían según la especie (Bauer *et al.*, 2003). Hirt *et al.* (2002), expusieron la teoría de la transferencia horizontal para estos genes, pero señaló que no existen pruebas suficientes para corroborarla, indicando que los datos sobre las TrxRs de protozoos eran escasos y aventuró la posibilidad de que pudieran aparecer otros protozoos con H-TrxRs en su genoma (Hirt *et al.*, 2002).

Las H-TrxRs de mamíferos, a diferencia de las bacterianas, son muy similares a la enzima glutatión reductasa (GR), tanto en su estructura como función, pero la TrxR tiene una región adicional (~16 aa de longitud) en su extremo C-terminal, el cual contiene otro motivo redox activo (Arner, 2009). Este motivo en algunos organismos, involucra la presencia del denominado aminoácido "Nº 21" o Selenocisteína (Sec, código de tres letras o U, código de una letra), que sustituye el azufre (S) por selenio (Se) en una Cys del extremo C-terminal, lo que le confiere características únicas presentes en las selenoproteínas gracias a las características redox y elevada reactividad del Se. La biosíntesis de selenoproteínas involucra la existencia de un mecanismo único de incorporación de la Sec durante la traducción. Este mecanismo inserta Sec en un codón stop (UGA) gracias a la existencia del correspondiente ARNtSec (Lu and Holmgren, 2009). La maquinaria biosintética de selenoproteínas incluye una estructura secundaria específica en la región 3'UTR del correspondiente ARNm denominada SECIS (*Sec Insertion Sequence*), un factor específico Sec de elongación, el ARNtSec, una proteína específica de unión a SECIS (SBP2), la proteína ribosómica L30, una proteína de unión al ARN de 43 KDa y la proteína SPS1 (serina/treonina kinasa) (Lu and Holmgren, 2009).

La estructura 3D de las H-TrxRs es similar a la de la GRs, ya que presentan dominios de unión a ambos FAD y NADPH, junto con una región inter-fase entre la región N-terminal y la C-terminal. Todas las H-TrxRs tienen un motivo CXXXXC involucrado en la formación reversible del disulfuro en la región de unión a FAD, además en su extremo C-terminal tienen un segundo sitio activo conservado que puede ser CC o CU, con la excepción de los protozoos del grupo apicomplexa, que tienen un segundo motivo CXXXXC en la región C-terminal (Figura 105). Diferencias en la presencia o no de Sec y los motivos catalíticos presentes en las regiones N- y C-terminales hace que las H-TrxR se puedan dividir en 4 tipos de organización molecular diferentes: Tipo-I (Apicomplexa) (con un segundo motivo CXXXXC en el C-terminal); Tipo-II (insectos) (con un motivo CC en el C-terminal); Tipo-III (algas, mamíferos, platelmintos, cnidarios y cordados) (con un motivo CU en el C-terminal) y Tipo-IV (algunos mamíferos) pueden tener un motivo Grx (glutathionredoxina) (CXXC o CXXS en el N-terminal), haciendo que sean más similares a TGRs (tioredoxina-glutatión reductasas) (Jacquot *et al.*, 2009) (Figura 105).

En el genoma macronuclear del ciliado *T. thermophila* hemos encontrado 5 homólogos de H-TrxRs, que hemos denominado *TtTrxR1-TtTrxR5*, los cuales codifican para proteínas con masas moleculares que oscilan entre ~53 y 73 KDa, incluyendo a la *TtTrxR5* que aunque su ORF está insertada en una ORF considerablemente mayor de 278 KDa (2.387 aa), al eliminarla de dos regiones presumiblemente codificantes para proteínas sin aparente homología (véase el siguiente apartado), presenta una masa molecular de 58,8 KDa. Igualmente, sus longitudes

Discusión

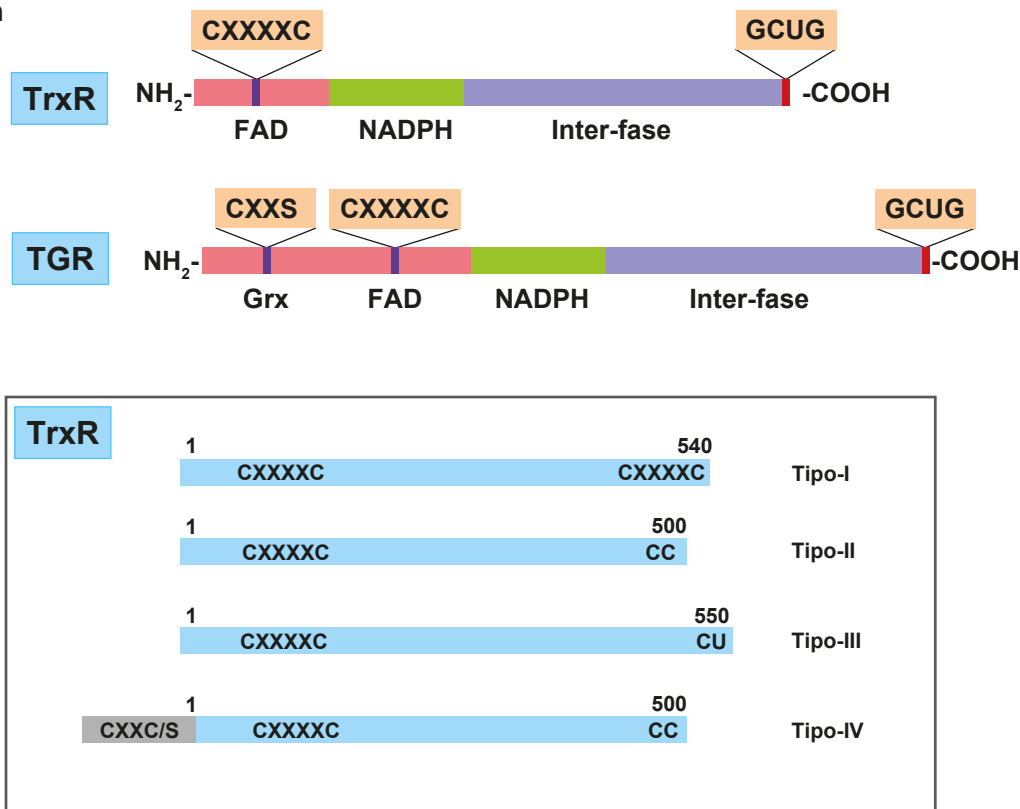


Figura 105. Representación esquemática de la configuración molecular de una TrxR y una TGR estándar. Abajo, se representan los cuatro posibles tipos de configuración de las TrxRs actualmente conocidas.

(485 – 638 aa) están dentro del rango de las típicas longitudes de otras H-TrxRs (~500 aa). Por lo tanto, junto con protozoos parásitos del grupo apicomplexa (como *P. falciparum*, entre otros), el protozoo ciliado de vida libre *T. thermophila* presenta igualmente H-TrxRs. En la Tabla 27, se muestra la presencia y/o ausencia de las tres principales enzimas de la familia de piridina-nucleótido-disulfuro oxidoreductasas (TrxR, GR o TryR) en los protozoos en que se ha estudiado. Los dos ejemplos del phylum Alveolata son los únicos que presentan H-TrxR (probablemente existan otros, como en *Paramecium*), que coexisten con GRs. El resto de los protozoos analizados o no tienen TrxR (sustituyéndola por GR y/o TryR) o la tienen del tipo L-TrxR como única piridina-nucleótido-disulfuro oxidoreductasa (Tabla 27).

Phylum	Protozoo	TrxR	GR	TryR	Referencia
Amoebozoa	<i>Entamoeba histolytica</i>	L-TrxR	-	-	(Loftus <i>et al.</i> , 2005)
Retortamonada	<i>Giardia lamblia</i>	L-TrxR	-	-	(Morrison <i>et al.</i> , 2007)
Axostylata	<i>Trichomonas vaginalis</i>	L-TrxR	-	-	(Muller <i>et al.</i> , 2003)
Heterolobosa	<i>Naegleria fowleri</i>	-	+	+	(Ondarza <i>et al.</i> , 2006)
Euglenozoa	<i>Euglena gracilis</i>	-	+	+	(Montrichard <i>et al.</i> , 1999)
	<i>Trypanosoma sp</i>	-	-	+	(Krauth-Siegel & Comini, 2008)
Alveolata	<i>Plasmodium falciparum</i>	H-TrxR	+	-	(Kapoor & Banyal, 2009)
	<i>Tetrahymena thermophila</i>	H-TrxR	+	(1)	Este trabajo

Tabla 27. Presencia (+) o ausencia (-) de tiorredoxina reductasas (L- o H-TrxR), glutatión reductasas (GR) y/o tripanotión reductasas (TryR) en protozoos. (1): Presenta actividad tripanotión reductasa.

El análisis de identidad (Figura 69) nos indica que los mayores valores de identidad de las TrxRs de *T. thermophila* los muestra con las H-TrxRs de mamíferos (hombre y rata), y entre ellas es la TtTrxR1 la que tiene mayor similitud (59 % con la especie humana ó un 58 % con la rata). Igualmente, el árbol filogenético inferido de las secuencias aminoacídicas (Figura 70) nos muestra que todas las TtTrxRs pertenecen al grupo de las H-TrxRs con un origen común. Este grupo está conectado con el de las GRs, pero completamente separado de las L-TrxRs. Además, las estructuras 3D inferidas de algunas de las TtTrxRs (Figura 71) muestran elevadas similitudes estructurales con una precisión del 100 % y un valor-E = 0 (máxima fiabilidad), con las H-TrxRs.

Tres de estas TtTrxRs (TtTrxR1, TtTrxR3 y TtTrxR4) contienen Sec en el C-terminal de la proteína (Figuras 24A, 26A y 27A del Anexo II) en un dominio redox GCUG (TtTrxR1) (como en algunas H-TrxRs de mamíferos) (Jacquot *et al.*, 2009; Lu and Holmgren, 2009) o SCUR/A (TtTrxR3 o TtTrxR4). Las dos restantes TtTrxRs (TtTrxR2 y TtTrxR5) contienen 2 Cys en los motivos redox activos del C-terminal, del tipo LCCG/A (TtTrxR2 y TtTrxR5, respectivamente) (Figuras 25A y 28A del Anexo II). Como las cinco TtTrxRs son H-TrxRs, todas contienen el motivo catalítico CXXXXC del tipo CVNVGC (típico de mamíferos) (Arnér, 2009) (Figura 106). Por consiguiente, las H-TrxRs de *T. thermophila* se podrían incluir en las de tipo-II (como la de insectos) (TtTrxR2 y TtTrxR5) y de tipo-III (las tres selenoproteínas) (como las de mamíferos) (Jacquot *et al.*, 2009) (Figuras 105 y 106).

Como ya se indicó anteriormente, las selenoproteínas presentan las denominadas secuencias SECIS (Martin *et al.*, 1996) en la región 3'UTR del ARNm a una distancia de 50-110 bases del verdadero codon Stop (estructura fundamental para llevar a cabo la incorporación de la Sec en un codón UGA presente en la ORF de la proteína). La presencia de un ARNtSec en *T. thermophila* que puede introducir Sec en un codón UGA, ya fue demostrada en 2005 (Shrimali *et al.*, 2005), e igualmente, también ha sido detectada la presencia de secuencias SECIS en la región 3'UTR de tres de las TtTrxRs, (Coyne *et al.*, 2008). Estas TtTrxRs (TtTrxR1, TtTrxR3 y TtTrxR4) presentan secuencias SECIS (Figuras 24A, 26A y 27A del Anexo II), localizada a 161 bases del codón Stop en el gen *TtTrxR1* (algo más alejada del codón de parada respecto de la distancia en que generalmente se encuentra) o a 60 y 91 bases en los genes *TtTrxR3* y *TtTrxR4*, respectivamente. Sus estructuras en horquilla (Figura 66) son similares a las que presentan las 3'UTRs de selenoproteínas de algunos gusanos platelmintos (cestodos y trematodos), e igualmente presentan el cuarteto de bases AUGA (presente en mamíferos, insectos y gusanos platelmintos). La horquilla principal (en algunas secuencias SECIS puede haber otras 1 ó 2 horquillas secundarias) comienza en el nucleótido uracilo (la segunda base del cuarteto AUGA conservado), el cual junto con los siguientes nucleótidos no aparean según el modelo de apareamiento estándar de Watson

```

TtTrxR1 -----MDVEFKY-----
TtTrxR2 -----MEIEIQE-----
TtTrxR3 MFCKLKRINSGRLRYFSSNQOQNQHONYFNFQNDNNSTSQSANNFEFKNEENYQKNDNQGSQNSQFDEIELPPFSDQODEDEK
TtTrxR4 --MILKSLKN-----KSQQLYKGFQIKSLQTLAKSNFSTGFKGFNLQKKKPLIDEK-----
TtTrxR5 --MINK-----FQKH-----FVDSQARFGLFISRKYFSFKKIDLNKKQEQE--
TtGR1 -----MQQQQQQ-----

TtTrxR1 -----DFFVIGGGSGGLAAAKEAASFGARVAVADFVKPSVPGTKWGLGGTCVNVGCIPKKLMHFAASYG
TtTrxR2 -----EFDFFVIGGGSGGLAASKEAAQFGVKVGLADFVDPTPIGTKWGLGGTCVNVGCIPKKLMHYAATYG
TtTrxR3 QDENKIQYLSQEKNDILHQKYDVAIIGGGSGAGLFAFEAHKLGKMTILFNFVEPTFRGNKWGLGGTCVNVGCIPKKLFHTASIIK
TtTrxR4 -----VNKQHYDVAIIGGGSGGLAFAFEAQKLGMKAVVDFVEESTQGSNWGLGGTCVNVGCIPKKLMHTAALYK
TtTrxR5 -----NKEFDFFVIGGGSGGLAASKEAAQLGAKVGLADYVAPTPIGTSWGLGGTCVNVGCIPKKLMHIAAQYG
TtGR1 -----EYQYDYFVIGGGSGGQASAKEAASFGARVGLADFVKPSVPGSTWGLGGTCVNVGCVPKKMFHYASEFG

TtTrxR1 ESHEAQKNMGWTE-----IKEKN-KHEWQPMVERVQAHIKLWGYKVELAEKEVKYNSLASIVGKNTIELTN-
TtTrxR2 ESMEMQRISGWKN-----VNEEQKTHEWQKLVERVQNNVKKTNFGYKVALRENKVKYFNYYASLVDKNTIKLEN-
TtTrxR3 DSLKLSADFGFGGDRQQFQIDLDHNNPEKNKQLLNFRWRQLVSNVQNYISDLNLGFEAQLINRSIPYVNALATLGDKNTIYYTTN
TtTrxR4 EVILNSSGYGF-----DLEGKNLEEKYKQEYLVWQHLVNNVQSYIKSINFGYKKSIGELNIDYVNAFASFYDKNTLVFSPK
TtTrxR5 ESYEQQEISGWN-----VNRQSIQNNWVQLVHRIQENVKRTNFGYRVSLRENKVTYFNSLATIIDQNTIKLQSG
TtGR1 DILEHQRNAGW-----EVPHN-INHNWSTLVNKVQTYIKRLNGIYMDALKDKKVTYNAFASLKDKNITQLED-

TtTrxR1 -----RKGEKEQVTAKYIILIAVGGRPTFLD---IPNTEKLVITSDDIFSMQNPPGKTLVVGASYIALEACAGFLA
TtTrxR2 -----KTGVIYVKAHILISVGGRPNYLP---HID-SKLIITSDDLFSLQTPPGKTLIAGGSYIALEACAGFLN
TtTrxR3 KYDLDAIQRRDFSKLISQI---KADYIVIAVGGRPKYIK---ECENSEKYSITSDDIFSLKNPPGKTLVLSGSYIAFESAGFLS
TtTrxR4 VDAISGFLKDNESEYKANTEQLGYVTADKIVVAVGGRPQLLSDSQNSNKYAITSDDIFMQKKPPGKTLVIGGGYIALECSGFLS
TtTrxR5 E-----QLKDAIYVKAQILISVGGRPNYLP---HID-RNLVITSDDLFSLTTPPGKTLIVGASYIALEACAGFLN
TtGR1 -----INGNKTEVTSKYIILLALGGRPKYLDE---IPNIRELAITSDDIFFQNTPPGKTLVVGASYVIALEACAGFLN

TtTrxR1 GFGYDVTVMVRSILLRGFDQEIIEKIGEYMARHG-TKFIRGTVPHHIEATPDGRRRVVWVKSPEVGQGDVEEIDFTVMLAIGRTSD
TtTrxR2 GLGYDVTVLYRSVLLRGFDQDVAERMQTYMAHHG-VKFVQGEI-KDVQLENETKQVVYTN---GSS-DTFNTVLLAIGRIPN
TtTrxR3 NLGMNTTLMARGQYLRFQDIAQMIVEDMKQFNGVRFIQHSVPYKIEKDDKDYVVCYKSIKNND--QCDKFQTVLQAVGRQPN
TtTrxR4 TLGYDTTMMTRSLYLRFDQDIKMIENIQTHSKVKVPTSLPVSLEKVEDTLKVKIQNQEDKSKIYEDTFNTVLMIAIGRKPN
TtTrxR5 GLGYDVTVLYRNKILSGFDQDVAQKLQEYMSYHG-VKFVKDEI-KHISTHNSQREVTFNF---GGQKEIFDFTVMLAIGRVPN
TtGR1 GLGYDVTVLYRSKVLANFDQEAQKVKLQKMHG-VKFIEGAVPTSIKLSEQGDLDKHVEYKNTQTGELVGDHFKTVLIAVGRG

TtTrxR1 TKNIGVETMGITK-PNGKIIA---NDDDTTNVENIFAIGDCVDKRPETPTAIAKAGRLARRLFNGDTK-----LMDY
TtTrxR2 TKKLGLENVGIPVT-KSGKIQS---DDLDRTTVENIYAIGDAVEGRMELTPLAIAKAGRYLARRLYNNENI-----SLDY
TtTrxR3 VSLNLDQIGVQVHSETKKIIGGYNEDSERTSDNIFSVGDVLHGVPENPIAQMKGKLLAHRIIFGLKMN--DNMKYYNRHKMDY
TtTrxR4 TQKLNLKGVQVQLNQKNKIQGRFNDELEQTSVEGIYALGDVLDGVPELTTPVAQKQGLLARRIQHKKENKEPNTVFIQKNSMDY
TtTrxR5 TQSLGLENVGVKLS-KNRKILA---DQKDQTSVSNIFAIGDAVEGRMELTPVAIKQGRFLAQRFLNNQNE-----LVDY
TtGR1 AQTKGVNLEQVGVQLTKDGKIVCD-DS-DTTAIPNIFSVGDCVEGRLELTPTAIAKAGRLARRLFNNQ-----QQLMQY

TtTrxR1 NSIPTTTFPTIEYGTIGLSEEDAKTKYGEDNIKVYYSIPTPLDWSYSDHKHDD-----KGHAKLIVNKADDERVVGPHYLGPNA
TtTrxR2 KIVPTTTFPTIEYSAIGLTEEEAIKTYGSENVSVSKFKPLEWVLSKDNDNS-----RGYCKLIVHNKQNERVLGLHYLGPNA
TtTrxR3 NCIPTTLFTPQEYSFVGLNEEQALQOYKDRVEIYHSRFTPLEEQLTFSYDDQGNIIKRKSYCKLICDKFDNNRILGMHYFGPNA
TtTrxR4 NDFPTTTFPTPVEYSCAGYSEKQAVEKFGREENIEVYHSKFTPLEEQLSPRVDENFDTIYRKAYAKVICNKLDNERNVVGPHYLGPNA
TtTrxR5 NTIPTTTFPTPLEYSCIGLSEEQAIQKFGQENIWCYVSKFKPLEWTFSEKDNKS-----RGYCKLIVNRQDNERIIGLHYLGPNA
TtGR1 HNVPTTTFPTPLEFGTVGLSEEQAAKKGKDNLNLIWISTFKPMDWQYSV---AKQDD---RAICKLITVKNNDKVIGLHYIGPQA

TtTrxR1 GEVTQGFIAIAFKFKATKANFDDVVGIIHPTAYEEFTTLKNVKGEAGEAES-GCUG
TtTrxR2 AEVAQGFVAMQLGATKADFDTVAIHPSAEEELVLLKQIKGISSETDEW-LCCG
TtTrxR3 GEVMQGYAVAFKMNLFKHQLDSSVGIHPTCAEELNLKVKTKSSGEDFDKDSSCUR
TtTrxR4 GEVMQGYGVAMKLGMTKADLDRTVGIHPTTAEFTNLSTKASGEDCEKTSCUA
TtTrxR5 AEVAQGYAVAFQMGATKRDFTKTAIHPSSEEFVLLKQIKGISSETEEW-LCCA
TtGR1 AEVTQGFVAIAIQMGANKEDFDNTVAIHPSYAEFFVLLRTPRL-----

```

Figura 106. Alineamiento de las diferentes TtTrxRs junto con la TtGR1. En sombreado amarillo se destaca el motivo CXXXXC (típico de las H-TrxRs), y en azul la región catalítica C-terminal compuesta por dos CC o por CU. El resto de aminoácidos idénticos están sombreados en gris.

y Crick, la adenina aparea con la guanina y el uracilo con cualquier otro nucleótido (Figura 66). La horquilla principal (en mamíferos) suele tener entre 12 y 16 pares de bases, tras la cual, hay un lazo de bases desapareadas que contiene 2 ó 3 adeninas (Krol, 2002; Kryukov *et al.*, 2003). Un alineamiento entre diferentes secuencias SECIS (Figura 107) de diferentes selenoproteínas muestra la elevada conservación del cuarteto AUGA entre organismos filogenéticamente muy alejados. Igualmente, presentan el par AA (localizado en una región-bucle apical de no apareamiento) (Figura 66) y la región conservada UGA (de unión no canónica con bases del cuarteto antes citado) (Figura 66 y 107). El rango de longitud de las secuencias SECIS está entre 93-103 bases (Figura 107).

TtTrxR1	-AAAUAUACCUUCAACUGGUA-GGAAUAUAUGAUUAGAGAACUCCUAAACCUCACUGAGGAGGUUUUUA---UGAGGCAA
TtTrxR3	-AAUUUAUAUAUCUUAAGAUGUAUAGUAUAUGAUAGCAAUUCGAAAUCUU-AGGAUUGGAUUAAGGCU---UGAAUAG-
TtTrxR4	-AAAACAAAGUAAUUUAUCUAAUAUGGAAAUGACGAAUUUAGUCUAAACUGUAAAACAGGGAUUAUUUC---UGAAAAAU
Gpx3 (Mus)	CGUGUACCCAGGUCAGGGGUG-GUGUCUCUAUGAAGG-AGGGGCCCGAAGCCCU-UGUGGGCGGGCCUCCCC---UGAGCCC-
Txnrd2 (Rattus)	-CAGCCUUCACACACUGCCAGU-GUCAGAUGAUGACGGCCUGUGCAGAAACCCCCACGUGGGCUGCCAGGUU---UGAAC---
SEPN1 (Homo)	-----CAGUGGCUUCCCGGCA-GCAGCCCCAUGAUGG-CUGAAUCCGAAAUCCU-CG---AUGGGUCCAGCU---UGA-----U
TXNRD1 (Homo)	-AUUUGGCAGGGCAUCGAAGGG-AUGCAUCCAUGAAGUCACCAGUCUCAAAGCCCA-UGUGG-UAGGCGGUGA---UGGAAC--
Sepx1 (Mus)	CCUGCCAACCGCUCAGCCUCA-GUCACCGAAUGAUCUGCUCUGGUCAAAUCUUCUAUG---CCAGCCAGGGUGGUGAUG---
GPX3 (Homo)	-ACGGACCCCAUGGCAGGGGUG-GCGUCUUCUAUGAGGG-AGGGGCCCAAAGCCCU-UGUGGGCGGACCUCUCCC---UGAGCCU-
BthD (Drosoph)	CAAAACAAAGCGUUCAGCAAUA-G-AGCCCUAUGAUCG-AUGAUUGGCAAAUCCU-CUCGAGGAACCGAUCGU---UGAGAAC-
SELK (Homo)	ACAAGGACUGCUCUGUGUCCUC-ACAGAUGAUGAGGU-CAUGCUGGGAAUCCC-UCUGCAGGGAACUGGCC---UGA-CUG-

TtTrxR1	GAUUAUUGAUUUUGUUGUAG-----	98
TtTrxR3	UCAGAGUAAUAAGAGUAUUUAUA---	102
TtTrxR4	AUAUGACAAUUUAGA-----	94
Gpx3 (Mus)	GUCUGUGGUGCCAGCCCU-----	96
Txnrd2 (Rattus)	CCCUGGCAUUUCUGGAGUGCU-----	97
SEPN1 (Homo)	GUCUUUGCAGCUGCACCUAU-----	86
TXNRD1 (Homo)	AACUGUCAAAUCAGUUUUAGCA-----	96
Sepx1 (Mus)	ACCCGUGACCUUUGAGGAG-----	96
GPX3 (Homo)	GUCUGAGGGGCCAGCCC-----	93
BthD (Drosoph)	CCCUUUGCCUUUGUUGAUCGCUCAU-	103
SELK (Homo)	ACAUGCAGUUCUAAUAAUGCAGAUUU	103

Figura 107. Alineamiento de secuencias SECIS presentes en las regiones 3'UTRs de selenoproteínas de algunos organismos (incluyendo las 3 TrxRs de *T. thermophila*). Subrayado en amarillo se señalan las regiones altamente conservadas. El número total de bases se indica al final de cada secuencia.

5.1 Características de la ORF que contiene la TtTrxR5 de *T. thermophila*.

En la base de datos del genoma de *T. thermophila* (www.ciliate.org) el elemento denominado THERM_00723630 se identifica como un único gen u ORF (de 9.171 nucleótidos) con 8 intrones. Este elemento contiene una posible sub-ORF que hemos identificado como TrxR y denominado *TtTrxR5*, la cual presentaría dos pequeños intrones, y que se extiende desde el nucleótido 3.545 (codón de inicio ATG, que inicialmente estaría en la parte final del 1º intrón según la ORF original de la base de datos) hasta el nucleótido 5.223 (codón de parada TGA) (Figuras 67 y 28A del Anexo II). Por lo tanto, la ORF de este gen *TtTrxR5* tendría 1.572 bases (523 aa) (Figura 108).

MINKFQKHFDVDSQARFGLEFISRKYFSFKKIDLNKKQEONKEFDFFVIGGGSGGLAASKEAAQLGAKVGLADYVAPTPIGTSWGLGGT CVNVGCIIPK
 KLMHIAAQYGESYEQEISGWNVNRQSIQNNWIQLVHRIQENVKRTNFGYRVSLRENKVITYFNSLATIIDQNTIKLQSGEQLKDAIYVKAKQILISVG
 GRPNYLPHIDRNLVITSDDLFSLTTPPGKTLIVGASYIALE CAGFLNGLGYDVTVLNRNKILSGFDQDVAQKLQEYMSYHGKFKVDEIKHISTHNS
 QREVTFNFGGQKEIFDTVMLAIGRPNTQSLGLENVGVKLSKNRKILADQKDTSVSNIFAIGDAVEGRMELTPVAIKQGRFLAQRLENNQNELVDYN
 TIPTTIFTPLEYS CIGLSEEQAIQKFGQENIWCYVSKFKPLEWTFSEKDNKSRGYCKLIVNRQDNERIIGLHYLGPNAAEVAQGYAVAFQMGATKRDF
 DKTIAIHPSSEEFVLLKQIKGISETEEWLCCA/tgatttaataattttatttgaattttttatcattataaaaaaaattcctaaattctcaaaagaaa
 aaaaattatataaaagcaaacagaattaatttaacgtctataatttataaaacttattttaatctaaaaataaaaattaaaatgatttaaaagtttaatttaa
 ataaccttttagttggttgattgtctttgttaaattatcaaaataattttatttgttaaatataaaattaaataataaat

Figura 108. Secuencia aminoácídica inferida de la ORF del gen *TtTrxR5* extraída de la ORF original de 9.171 nucleótidos (THERM_00723630). Se subraya en verde la región N-terminal extraída del final de la presumible secuencia del 1º intrón según la ORF original, y, por lo tanto, no contemplada en el mismo. Subrayada en amarillo se indican el dominio CXXXXC (CVNVGC como el de los mamíferos) y en azul el C-terminal (CC). Los residuos de Cys están en rojo. A continuación de la secuencia aminoácídica se muestra (a partir del codón de terminación tga) lo que podría ser la 3' UTR (secuencia nucleotídica en azul) de esta ORF (y que en la ORF original se considera un intrón), en la que se detectan tanto motivos canónicos de poliadenilación (sombreados en marrón) como de potencial degradación del ARNm (sombreados en rosa).

Los dos últimos nucleótidos del último codón codificante junto con el codón de parada (TGA) de este ORF estarían dentro de lo que la base de datos considera el 4º intrón (Figura 28A del Anexo II). Y así, una primera posibilidad es que este 1º intrón tendría que llevar la región 5'UTR con los elementos reguladores de la expresión de dicha ORF (*TtTrxR5*). También cabría la posibilidad de que se transcriba todo el ORF original (9.171 bases), y que un procesamiento post-transcripcional liberara la sub-ORF conteniendo la *TtTrxR5*. Con respecto a las 2 regiones (podemos llamarlas A y B) que potencialmente se transcriben como una única ORF (que están localizadas a ambos flancos de la sub-ORF codificante de la *TtTrxR5*) (Figura 28A del Anexo II), podemos mostrar, tras un intenso análisis *in silico* de las mismas, las siguientes características:

1) La región que denominamos A (o N-terminal de la ORF original) se compone 1.015 aminoácidos, una masa molecular inferida de 11,95 KDa y un pl : 9,4, siendo así una proteína con carácter básico. Lo más llamativo de la misma es su elevado y similar contenido en dos aa polares; glutamina (Gln) (135 residuos ó 13,3 % del total de residuos) y asparagina (Asn) (132 residuos ó 13,0 % del total de residuos), y un, igualmente, elevado contenido en un aa cargado (+) como la lisina (Lys) (107 residuos ó 10,5 % del total). La región B (o C-terminal de la ORF original) es de menor tamaño (861 aa), una masa molecular estimada de 10,18 KDa y un pl : 9,3 (también básica). Y al igual que la región A, es igualmente rica en residuos de Gln (112 ó 13,0% del total), y en el aa con carga (+) lisina (Lys) (108 ó 12,5% del total). La utilización de codones codificantes de Gln en la región A es; UAA (52,2 %) >>UAG (22,7 %) >CAA (16,1 %) >CAG (8,8 %), mientras que en la región B es; UAA (48,6 %) >>CAA (22,0 %) >UAG (21,1 %) >CAG (8,2 %), lo que nos indica que ambas regiones siguen la norma general de utilización preferente de codones descrita en *T. thermophila*, siendo UAA el más utilizado, sin embargo para el segundo codón mayoritariamente usado en la región A es el UAG, y en la región B es el CAA (más acorde

con el ~28% establecido para la mayoría de los genes). Desconocemos el significado, si existe alguno, de estas desviaciones en la utilización de codones de la Gln, dos de los cuales (UAA y UAG) son codones universales de parada, ya que *T. thermophila* usa el codón UGA como único codón de parada.

2) Para ambas regiones el índice de inestabilidad es > 52 , por lo que ambas proteínas se consideran como inestables, mientras que la secuencia aa inferida de la sub-ORF que constituye la TtTrxR5 se clasifica como proteína estable. Por consiguiente, dos regiones de aa inestables rodean a la proteína TtTrxR5 estable.

3) Un alineamiento llevado a cabo entre ambas regiones (A y B) nos da un valor de identidad de ~18-19 % (lo cual es más bien bajo). Es decir, a pesar de mantener semejanzas en cuanto a la riqueza de determinados aa, sus secuencias no son muy similares.

4) Un análisis de similitud (BLAST) de la región A con bancos de secuencias muestra una cierta identidad (~26 %) (en una corta región de la misma, localizada en el extremo N-terminal) con una región (N-terminal) del elemento Sel-1L2 de ratón (*Mus*), o Sel-1L2 de rata (*Rattus*) (~27 % identidad). Las proteínas "Sel1" se caracterizan por poseer motivos repetidos de secuencias degeneradas de 34 aa, las cuales son similares a las repeticiones en tándem (3-6 motivos) denominadas tetratricopéptidos (TPR) presentes en muchas proteínas, y que están involucrados en facilitar las interacciones entre proteínas y en el ensamblaje de complejos multiproteicos (Das *et al.*, 1998). Las proteínas con repeticiones Sel1 constituyen una de las familias de la superfamilia de péptidos tetraticos, que fueron originalmente identificadas en una molécula receptora de *Caenorhabditis elegans* (Grant and Greenwald, 1996). Las regiones Sel1 están extensamente distribuidas entre los tres dominios del árbol de la vida, incluyendo protozoos parásitos como los géneros *Plasmodium*, *Leishmania* y *Trypanosoma*. Tras una exploración bibliográfica en búsqueda de proteínas con motivos Sel1 o TPR junto con la presencia de un motivo funcional TrxR nos encontramos (Lee *et al.*, 2009) con una proteína (AtTDX, con 380 aa) de *Arabidopsis thaliana* que presenta 3 repeticiones del tipo TPR en su región N-terminal, una región de aa básicos y posteriormente un dominio con función TrxR. Esta proteína (AtTDX) presenta múltiples funciones dependiendo de su estado oligomérico, actuando alternativamente como TrxR y chaperona de plegamiento (ambas funciones van unidas) en estado de monó- u oligómeros y chaperona de mantenimiento (en estado agregado). La última función proporciona a la planta una mayor protección contra el estrés por choque térmico (Lee *et al.*, 2009). Más recientemente (Prasad *et al.*, 2010), un análisis *in silico* en el genoma de *Arabidopsis* ha revelado la presencia de proteínas con motivos TPR en 4 proteínas con dominios Trx, las cuales pueden potencialmente interactuar con chaperonas Hsp90 y Hsp70. Los motivos TPR están localizados en α -hélices (Alag

et al., 2009). La región A de nuestra potencial proteína tiene muchas α -hélices que se agrupan en una configuración 3D que encuentra homología estructural con proteínas contráctiles (con un 100 % de precisión y un valor $E = 9,8 \times 10^{-30}$), en la mayoría de las α -hélices predominan los residuos Gln y Lys (abundantes en la secuencia de la región A), pero no hemos encontrado ningún patrón de repetición conservado que nos indique que puedan ser secuencias similares a TPR. Además, la región A no muestra secuencias repetidas del tipo Sel1 o de ningún otro tipo conocido, estando la región que muestra cierta identidad con ella localizada fuera de las repeticiones Sel1 de la proteína Sel-1L2 de ratón o rata. El análisis de la región B (C-terminal de la ORF original), tampoco nos aclara mucho sobre su posible función por homología, ya que la máxima identidad (~36 %) la tiene con proteínas no caracterizadas de diferentes organismos. Nada, por lo tanto, obtenemos del análisis de similitud de ambas regiones que nos puedan ayudar a solventar su función.

5) Un análisis de su posible localización intracelular, nos indica que no tienen motivos transmembrana ninguna de las dos regiones (A ó B), y que su probable localización es nuclear o citoplasmática.

6) La búsqueda en diferentes genotecas de expresión de *T. thermophila* de la presencia de las regiones A y/o B, junto con la TtTrxR5, mostró que existen 5 ESTs (secuencias expresadas) relacionadas con esta ORF (A+TtTrxR5+B). Dos de ellas se encuentran localizadas en la TtTrxR5, mientras que las tres restantes están localizadas posteriormente a esta. Especialmente interesante es la secuencia con número de acceso DY678605.1., la cual fue aislada de genotecas de expresión obtenidas en condiciones de inanición (1-6 h) (Turkewitz, A.P., datos no publicados) y abarca desde el nucleótido 4.597 hasta el 5.469 (tras eliminar la 2ª secuencia intrónica que contiene TtTrxR5), de tal manera que contendría 251 nucleótidos del supuesto intrón localizado tras TtTrxR5 (según la ORF original) (Figura 109). El descubrimiento de esta EST con un intrón ya procesado y eliminado, podría estar indicando que la región inmediatamente posterior a la sub-ORF TtTrxR5 no se trate de un intrón, tal y como está definido en la ORF original, si no de una región 3'UTR reguladora, a pesar de que no se ha detectado un ETS con cola poliA. Igualmente, en las proximidades del codón de terminación TGA de la ORF (TtTrxR5) hacia el 3'UTR se detectan varios motivos canónicos de poliadenilación y degradación de ARNm (Figura 108). Ambas observaciones podrían apoyar la idea de que la sub-ORF (TtTrxR5) podría expresarse independientemente del resto de las regiones A y/o B de la ORF originalmente descrita.



Figura 109. Localización de la secuencia de expresión DY678605.1. En color morado se destaca la sub-ORF que codifica TtTrxR5 (flanqueada por las regiones A y B de la ORF original), y en color verde se muestra la secuencia DY678605.1 detectada en la genoteca de expresión. Cebadores: P1A es TtTrxR5A, P1B es TtTrxR5B.

5.2 La GR de *T. thermophila* (TtGR1).

La enzima glutatión reductasa (GR) (EC 1.8.1.7) es otro miembro (junto con las TrxRs) de la familia de flavoenzimas (piridina-nucleótido-disulfuro oxidoreductasas) y cataliza la conversión del glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida (GSH), en presencia de NADPH (Dringen and Gutterer, 2002). Por lo tanto, esta enzima juega un papel crucial en el mantenimiento de una elevada GSH/GSSG ratio intracelular. En el genoma macronuclear de *T. thermophila* hemos detectado un gen codificante de una posible GR (denominada como TtGR1). Como se ha especificado en anteriores apartados, las H-TrxRs de mamíferos y las GRs son enzimas muy parecidas estructuralmente y funcionalmente (ya que las TrxRs pueden también reducir GSH). Ambos tipos de enzimas tienen el motivo catalítico CXXXXC (Figuras 106 y 110), que en mamíferos y protozoos coinciden en tener la misma secuencia CVNVGC. La masa molecular inferida de la TtGR1 (486 aa) es ~53,8 KDa, lo cual está dentro del rango de masas moleculares de otras GRs (~52 – 56 KDa), lo que es ligeramente inferior al rango que presentan las TrxRs (~53 - 73 KDa).

La matriz de identidades mostrada en la Figura 69, nos indica que la TtGR1 es más similar a las TrxRs que a las GRs (46-59 % con las TrxRs contra 32-39 % con las GRs). Los valores mayores de identidad los tiene con las TtTrxR1 (59 %) y TtTrxR2 (58 %). Lo mismo se muestra en el árbol filogenético de la Figura 70, en donde la TtGR1 está dentro del grupo de H-TrxRs. ¿Por qué, entonces, la consideramos una GR en lugar de una TrxR?. La respuesta está en la región C-terminal de las GRs, las cuales no tienen el segundo motivo catalítico XCCX o XCUX propio de las TrxRs (Figuras 106 y 110). Igualmente, el análisis BLAST de esta TtGR1 nos indica la presencia de dominios conservados del tipo GR con valores-E entre $\sim 1,3 \times 10^{-131}$ – $6,3 \times 10^{-89}$.

HsGR1	MALLPRALSAGAGPSWRRARAARFRGFLLLLPEPAALTRALSRAMACRQEPQPQPPPAAGAVASYDYLVIGGGSGGLASA
MmGR	MALLPRALGVGAAPSLRRAAR-----ALTCTMASPGEPQPPAP-----DTSSFDYLVIGGGSGGLASA
CrGR	-----MAEEDLVTLGAGSGGVRAS
PfGR	-----MVYDLIVIGGGSGGMAAA
TtGR1	-----MQQQQQE-----YQYDYFVIGGGSGGQASA
HsGR1	RRAAELG-ARAAVVESHK-----LGGTCVNVGCVPKKVMWNTAVHSEFMHDHADYGFPSK-----EGKFNWR
MmGR	RRAAELG-ARAAVVESHK-----LGGTCVNVGCVPKKVMWNTAVHSEFMHDHVDYGFQSC-----EGKFSWH
CrGR	RFAATLYGAKVACVELPFGFVSSETVGGAGGTCVIRGCVPKKLLVYGAAYAEFADARGFGWALPAAGAGAEGGPAHDWA
PfGR	RRAARHN-AKVALVEKSR-----LGGTCVNVGCVPKKIMFNAAVHDILENSRHYGFDT-----KFSFNLP
TtGR1	KEAASFG-ARVGLADFVKPSPQGSTWG-LGGTCVNVGCVPKKMFHYASEFGDILEHQRNAGWEVPH-----NINHNWS
HsGR1	VIKEKRDAYVSRNLAIYQNNLTAKSHIEIIRGHAAFTSDP---KPTIEVSGKK-----YTAPHILIATGGMPSTPHE
MmGR	VIKQKRDAYVSRNLTIYQNNLTAKSHIEIIRGHAAFTSDP---RPTVEVNGKK-----FTAPHILIATGGVPTVPHE
CrGR	SIMKLKEKEITRLNSTYGNILKNANVALIEGRGALKDAH---TVEVTAADGSR-----LLKAKHVLITATGGVATAIP-
PfGR	LLVERRDKYIQRLNNIYRQNLKSKVDLYEGTASFLSENRIKGTKDNNNKDNGLNNEEILEGRNIIAVGNKPVFP--
TtGR1	TLVNKQVTVIKRLNGIYMDALKDKKVITYNAFASLKDN---TIQLEDINGNK-----TEVTSKYILLALGGRPKYLD-
HsGR1	SQIPGA-SLGITSDGFFQLEELPGRSVIVGAGYIAVEMAGILS---ALGSKTSLMIRHDKVLRSFDSMISTNCTEELENA
MmGR	SQIPGA-SLGITSDGFFQLEDLPSSRSVIVGAGYIAVEIAGILS---ALGSKTSLMIRHDKVLRNFDLSISSKCTEELENA
CrGR	--MEGAEHAIMSDDALQSLPPGPIVVLGAGYIATEFAGIFRGTHAAQYAVHLMFRGDKVLRGFDEECRDQVQDNLTRR
PfGR	-PVKGI-ENTISSDEFENIKES-KKIGIVGSGYIAVELINVIK---RLGIDSYIFARGNRILRKFDSEVINLENMDMKN
TtGR1	-EIPNIRELAITSDDIFFQNTPEGKTLVVGASYVALECAAGFLN---GLGYDVTVLVR-SKVLANFDQEAQKVKLFMQKH
HsGR1	GVEVLKFSQVKEVKKTLSGLEVSMVTAVPGRLPVMTMIPDVCCLLWAIGRVPNTKDLNLKLGITQDDKGHIIVDEFQNT
MmGR	GVEVLKFTQVKEVKKTSSGLELQVVTSPVGRKPTTTVIPDVCCLLWAIGRDPNSKGLNLNKVGIQTDKKGHIIVDEFQNT
CrGR	GIHLHPGCKPTKLEKHGEGDLTLHYTDGTGAQS---LKCGLVMMATRRKPRVDGIGLEAVGVALDGGQAIKVDERSRT
PfGR	NINIVTFADVVEIKKVS--KNLSIHLSDGR-----IYEHFDHVIYCVGRSPDNTENLNLGKLNVTNNN-YIVVDENQRT
TtGR1	GVKFIEGAVPTSILKLEQGDLDKHKVYKNTQTGELVGQDHFKTVLIIVGRGAQTGKVNLEQVGVLTKDKGKIVCDDSDTT
HsGR1	NVKGIVAVGDVCG-----KALLTPVAIAAGRKLHRLFEYKEDSKLDYNNI
MmGR	NVKGIVAVGDVCG-----KALLTPVAIAAGRKLHRLFECKQDSKLDYDNI
CrGR	NVPDVWAIGDVTN-----RINLTPVALMEGMAFAKSCFGGELT-KPDYRNV
PfGR	SVNNIYAVGDCCMVKKSKEIEDLNLLKLYNEETYLNNKENVTEIDFYNVQLTPVAINAGRLADRLFLKKTR-KTNYKLI
TtGR1	AIPNIFSVGDCVEG-----RLELTPVAIAKGRMLARRLFNNQKQ-IMQYHNV
HsGR1	PTVVFSSHPIGTGLTEDEAIHKYGIENVKTYSTSTPMYHAVT---KRKTKCVMKMCANKE-EKVVGIIHMQGLGCDE
MmGR	PTVVFSSHPIGTGLTEDEAVHKYKDNVKIYSTAFTPMYHAVT---TRKTKCVMKMCANKE-EKVVGIIHMQGIGCDE
CrGR	ASAVFCQPPLATVGYTEEQAVKEFAG-NIDVYVSFRFPMKYTIS---GREEKTLMKLIVHAES-DVVLGCHMVGPDAP
PfGR	PTVVFSSHPIGTGLSEEAIIQYKENVKIYESKFTNLFFSVYDIEPELKEKTYLKLVCVGKD-ELIKGLHIIIGLNADE
TtGR1	PTTIFTPLFEGTVGLSEEAQAKKYKDNLNLIWISTFKPMDWQYS--VAKQDDRAICKLITVKNNDNKVIGLHYIGPQAAE
HsGR1	MLQGFVAVKMGATKADFNTVAIHPTSSEELVTLR-----
MmGR	MLQGFVAVKMGATKADFNTVAIHPTSSEELVTLR-----
CrGR	IMQGLAVALKCGATKAQFDSTVGIHPTAAEEFVTMRSSRRVPATGTSKL
PfGR	IVQGFVAVKMNATKKDFDETIPIHPTAAEEFLTLQPMWK-----
TtGR1	VTQGFVAVIQMGANKEDFNTVAIHPSYAEFEVLLRTPRL-----

Figura 110. Alineamiento de varias GRs eucariotas con la TtGR1. Sombreado en amarillo se destaca el dominio catalítico CXXXXC (también presente en las TrxRs). Sombreados en gris se indican los residuos idénticos. Cr: *Chlamydomonas reinhardtii*, Hs: *Homo sapiens*, Mm: *Mus musculus*, Pf: *Plasmodium falciparum*, Tt: *Trichomyces termophila*.

5.3 Consideraciones filogenéticas y ecológicas sobre las TrxRs/GRs.

La presencia de selenoproteínas se extiende a los tres dominios del árbol de la vida, lo que podría sugerir que el origen de la maquinaria implicada en la biosíntesis de selenoproteínas existía ya en el último ancestro común universal. El número de selenoproteínas identificadas en diferentes organismos varía desde 4-29 (el máximo detectado corresponde al alga verde *Ostreococcus tauri*). Los mamíferos presentan un número promedio de 24 ó 25 (Lobanov *et al.*, 2007), y en *T. thermophila* se han descrito 6 homólogos de selenoproteínas, de las cuales tres son TrxRs, dos Gpxs y una Selenofosfato sintetasa (Coyne *et al.*, 2008). El nematodo *Caenorhabditis elegans* tiene dos isoformas de H-TrxR, una es selenoproteína (preferentemente citoplasmática) y la otra no tiene Sec y es mitocondrial (Gladyshev *et al.*, 1999; Lacey and Hondal, 2006). Ninguna de las dos TrxRs de *T. thermophila* sin Sec (TtTrxR2 y TtTrxR5), poseen regiones con señalización mitocondrial.

Los cloroplastos contienen dos tipos de TrxRs; las FTR (ferredoxina:tiorredoxina reductasas) y las tiorredoxina reductasas dependiente de NADPH (NTRs), por lo que la Trx de plantas puede reducirse por FTR o NTR, a pesar de tener estructuras diferentes (Jacquot *et al.*, 2009). Y al igual que otras enzimas que tienen la misma función pero estructuras 3D diferentes, este podría ser un caso claro de evolución funcional convergente. Las TrxRs o NTRs tienen una historia evolutiva compleja. Las características estructurales de los dominios NADPH y FAD en las L-TrxRs o L-NTRs son similares a los de las GRs y las H-TrxRs. Sin embargo, las GRs y H-TrxRs presentan un dominio dimerizado extra que crea diferentes estructuras diméricas en ambos tipos de enzimas (Jacquot *et al.*, 2009). El sitio catalítico de las H-TrxRs está localizado en el dominio FAD, pero en las L-TrxRs está localizado en el dominio NADPH, además el mecanismo de catálisis es igualmente diferente debido a la presencia de Sec en algunas H-TrxRs. Por lo que las diferencias estructurales entre las H-TrxRs y GRs respecto de las L-TrxRs, se podría igualmente considerar otro ejemplo de evolución convergente (Kuriyan *et al.*, 1991). Se ha sugerido (Novoselov and Gladyshev, 2003) que las H-TrxRs se originaron de una GR procariota que desarrolló una extensión C-terminal conteniendo Sec. De la misma manera, al existir GRs en algunos protozoos filogenéticamente primitivos (euglenidos, alveolados) (Tabla 27), también se podría especular que las H-TrxRs se originaron de una GR eucariota primitiva, que probablemente adquirió de un procariota endosimbionte presente en el último ancestro común universal. El árbol de la Figura 70, nos muestra un origen común de la TtGR1 con el de las TrxRs, y a su vez el grupo de GRs y el de TrxRs (incluyendo la TtGR1) presentan un origen común con una proteína ancestral que podría ser similar a GR (según la hipótesis sugerida por Novoselov and Gladyshev, 2003). Pero

la presencia de la TtGR1 dentro de las TrxRs, nos hace pensar que al menos en algunos protistas (como *Tetrahymena*) la GR pudo surgir de una TrxR que perdió el típico C-terminal catalítico propio de estas enzimas.

Existe la hipótesis sobre una posible asociación entre la vida acuática y la presencia de selenoproteomas con un número elevado de selenoproteínas (Lobanov *et al.*, 2007). La elaboración de esta hipótesis se fundamenta en la pérdida de selenoproteínas eucariotas en diferentes phyla. Un análisis comparativo de diferentes selenoproteomas ha mostrado que organismos con abundantes selenoproteínas viven en ambientes acuáticos, mientras que aquellos que tienen un número significativamente menor de selenoproteínas viven en ambientes terrestres (excluyendo a los vertebrados de este análisis) (Lobanov *et al.*, 2007). Una posible explicación, según Lobanov y colaboradores (2007), para la ocurrencia de selenoproteomas grandes en organismos acuáticos podría ser la mayor disponibilidad de selenio (Se) en los océanos. Compuestos orgánicos de Se ocupan un ~80 % del selenio disuelto en los océanos, representando una fuente importante de Se para el fitoplancton. Esto explicaría la presencia de un elevado número de selenoproteínas en algas y peces. Los peces tienen selenoproteomas mayores que aquellos de organismos que viven en ambientes terrestres, incluyendo mamíferos, reptiles y pájaros (Lobanov *et al.*, 2007). Otra posible explicación para las diferencias entre el tamaño de los selenoproteomas de organismos acuáticos y terrestres podría ser el contenido de oxígeno (Lobanov *et al.*, 2007). El mayor contenido de oxígeno en el aire que en un medio acuático puede hacer que las selenoproteínas fuertemente reactivas sean más susceptibles a la oxidación en organismos terrestres, por lo que su uso estaría contra-seleccionado o no favorecido.

En la Tabla 28 se muestra una lista de organismos seleccionados con el número de probables selenoproteínas detectadas en sus genomas (selenoproteómica) y el ecosistema habitual en que viven. Entre los microorganismos eucariotas de vida libre predominantemente acuática, el ciliado *T. thermophila* es el que presenta un menor número de potenciales selenoproteínas (Tabla 28). Aunque este ciliado y otros pueden vivir perfectamente en un medio terrestre (con el suficiente grado de humedad), este ciliado como otros se encuentra preferentemente en hábitats acuáticos. En este sentido, este microorganismo eucariota, predominantemente acuático, no confirma la hipótesis propuesta por Lobanov *et al.*, (2007).

Organismo	Nº de Selenoproteínas	Ecosistema
<i>Ostreococcus tauri</i>	26	Acuático
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	16	Acuático
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	12	Acuático
<i>Volvox carteri</i>	9	Acuático
<i>Tetrahymena thermophila</i>	6	Acuático
<i>Dictyostelium discoideum</i>	5	Terrestre
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	Terrestre
<i>Oryza sativa</i>	0	Terrestre
<i>Drosophila melanogaster</i>	3	Terrestre
<i>Caenorhabditis elegans</i>	1	Terrestre
<i>Plasmodium falciparum</i>	4	Parásito

Tabla 28. Lista de organismos seleccionados (incluyendo *T. thermophila*) con relación al número de presumibles selenoproteínas detectadas en su genoma y su ecosistema habitual. Los datos están tomados de la referencia (Lobanov *et al.*, 2007), excepto el de *T. thermophila* tomado de la referencia (Coyne *et al.*, 2008).

5.4 Análisis comparativo de la expresión de los genes *TtTrxRs/TtGR1*.

Las diferentes formas de TrxRs presentes en mamíferos se expresan diferencialmente a nivel de tejidos, compartimentos celulares o condiciones de crecimiento (Arner, 2009). Igualmente, diversos estudios previos (Uziel *et al.*, 2004; Stoytcheva and Berry, 2009; Yang *et al.* 2010) muestran la inducción de estas enzimas bajo estrés oxidativo, desde las bacterias hasta los animales.

Del estudio por RT-PCR cuantitativo tanto de los cinco genes *TtTrxR1* – *TtTrxR5* (del *TtTrxR5* hemos diferenciado la expresión de la sub-ORF codificante de *TtTrxR5* y la expresión de la región B, localizada posteriormente a la *TtTrxR5*), como del gen *TtGR1* bajo el estrés originado por metales, podemos concluir los siguientes puntos:

1) Los genes *TtTrxR1*(selenoproteína), *TtTrxR2* y *TtTrxR5* (no selenoproteínas) responden en general con mayor nivel de expresión a tiempos tempranos de exposición (2 h), mientras que los genes *TtTrxR3* y *TtTrxR4* (selenoproteínas) responden con mayor nivel de expresión a tiempos tardíos (24 h). Existiendo, por consiguiente, un comportamiento diferente de expresión entre las cinco H-TrxRs de *T. thermophila*, para los mismos metales a la misma concentración. Para el gen *TtGR1* su mayor o menor respuesta es dependiente del tipo de metal y no del tiempo de exposición.

2) Para los genes de respuesta temprana (*TtTrxR1*, *TtTrxR2* y *TtTrxR5*) es el As^{5+} el que provoca los mayores niveles de inducción relativa, seguido del Cd^{2+} . Y entre los tres genes los valores de niveles de inducción son $TtTrxR2 > TtTrxR5 > TtTrxR1$, para los distintos metales ensayados. Es, por lo tanto, el gen *TtTrxR2* el que se expresa temprano y con mayores niveles ante el estrés por metales. Estos resultados vienen confirmados por resultados previos obtenidos en nuestro grupo de trabajo al analizar diferentes genotecas de expresión de *T. thermophila* obtenidas tras tratamiento con diferentes metales (datos no publicados), detectándose tres ESTs del gen *TtTrxR2* en genotecas de células tratadas con As^{5+} (1 h) y Pb^{2+} (3 h). Los genes *TtTrxR3* y *TtTrxR4* (de respuesta tardía) tienen los mayores niveles de inducción frente al Cd^{2+} y el As^{5+} , con valores similares. El gen *TtGR1* presenta los mayores niveles de inducción frente al As^{5+} y el Pb^{2+} , con valores considerablemente superiores a los correspondientes (para los mismos metales) registrados para los genes *TtTrxRs*. Por lo tanto, el ranking de valores (independientemente de su respuesta temprana o tardía) de inducción que el As^{5+} origina sobre estos genes es; *TtGR1* >> *TtTrxR2* >> *TtTrxR5* > *TtTrxR1* > *TtTrxR4* ≥ *TtTrxR3*. Con respecto al Cd^{2+} sería; *TtTrxR2* > *TtTrxR5* > *TtTrxR3* ≥ *TtGR1* > *TtTrxR1* ≈ *TtTrxR4*, y con respecto al Pb^{2+} ; *TtGR1* >> *TtTrxR1* ≈ *TtTrxR2*, el resto *TtTrxR5*, *TtTrxR3* y *TtTrxR4* no presentan valores significativos respecto del control, por lo tanto no se inducen. El Cu^{2+} no induce significativamente a la mayoría de estos genes, excepto al *TtTrxR2* (a las 24 h) (~ 5 veces el nivel basal) y al *TtTrxR5* muy ligeramente a las 2 h. Igualmente, el otro metal esencial (Zn^{2+}) testado no induce significativamente a estos genes, con la única excepción del *TtTrxR5* que presenta inducción significativa (~ 6 veces) a las 2 h respecto del control.

En resumen, frente a los metales más tóxicos y que pueden también originar estrés oxidativo (As^{5+} y Cd^{2+}) son los genes *TtTrxR2*, *TtTrxR5* y *TtGR1* los que mejor responden. Los tres codifican proteínas que no tienen Sec (no son selenoproteínas), por lo que podría ser que los residuos de Cys con grupos -SH (en lugar de -SeH) tengan mayor afinidad por los metales (como ocurre con otras proteínas (metalotioneínas) y/o péptidos (fitoquelatinas, GSH) con grupos -SH) inhibiendo así el sitio catalítico de las mismas, y, por lo tanto induciendo la expresión de estos genes con la finalidad de incrementar la concentración intracelular de estas enzimas, necesarias en la reducción de la Trx-oxidada o GSSG.

Se ha descrito que los iones metálicos pueden actuar como inhibidores de las TrxRs (Nishimoto *et al.*, 2006; El-Sharaky *et al.*, 2007; Newairy *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008). Estos estudios se han realizado con mercurio, cadmio y zinc, y en todos ellos se ha comprobado que la inhibición de la actividad enzimática conlleva un incremento en la expresión de los genes codificantes para estas proteínas. Las TrxRs que son selenoproteínas tienen tanto residuos de

Cys como Sec, mientras que las TrxRs que no son selenoproteínas tienen más residuos de Cys. Actualmente, no sabemos si ambos residuos son igualmente reactivos frente a los metales o si hay diferencias, aunque algunos autores suponen (sin pruebas experimentales) que la sensibilidad de las TrxRs a los metales se debe exclusivamente a la presencia de Sec (Arner, 2009). Por otro lado, moléculas con residuos de Cys (sin Sec) como la Trx o la Grx (glutathionredoxina) se inactivan por Hg. Por lo tanto, ambos elementos del sistema Trx (la propia Trx-reducida y la TrxR) pueden inhibirse con metales, lo cual induciría la expresión de genes *TrxRs* con la finalidad de originar Trx-reducida. Algo similar, podría ocurrir con el sistema GSH /GR, ambas con residuos de Cys en sus moléculas. En las TrxRs (selenoproteínas) de mamíferos, la adición de Se puede contrarrestar la hepatotoxicidad debida al Cd (Arner, 2009). Células Hela *knockdown* en TrxR1 incrementan su sensibilidad al Cd (Nishimoto *et al.*, 2006).

El metal esencial Zn^{2+} , no causó inducción significativa en la mayoría de los genes *TtTrxRs* y *TtGR1* (excepto en *TtTrxR5*) de *T. thermophila*, sin embargo en mitocondrias de mamíferos el Zn muestra una rápida e irreversible inhibición de la TrxR (Arner, 2009).

3) Respecto de la región B posterior a la sub-ORF codificante de la *TtTrxR5*, los resultados del patrón de inducción por metales, no se corresponde con el del gen *TtTrxR5*. Lo cual, ratifica que al menos las regiones *TtTrxR5* + B de la supuesta ORF original no se corresponden con un único transcrito (*TtTrxR5* + B) sino que son ORFs diferentes. Así, la expresión de esta potencial ORF (región B sin homología con proteínas de función conocida) induce su expresión, preferentemente temprana (2 h), por $Cu^{2+} > As^{5+} > Cd^{2+}$, y no se induce por Zn^{2+} o Pb^{2+} (2 h de tratamiento). El resultado más llamativo del patrón de expresión de esta región B es el nivel de inducción relativa, y significativa respecto del control, que se obtiene con el tratamiento de inanición durante 24 h (Figura 74), la cual alcanza un valor de ~32 veces el valor basal, lo que contrasta con los resultados obtenidos para todos los genes *TtTrxRs* y *TtGR1* en donde la inanición no induce la expresión de estos genes. Sin embargo, en genotecas de expresión obtenidas en *T. thermophila* tras inanición (1-6 h) (Turkewitz, A.P., datos no publicados), se han detectado tres ESTs (DY678605.1.) que corresponden con la parte final del gen *TtTrxR5* (Figura 109). Los cebadores que se han utilizado para el análisis por RT-PCR cuantitativo de la expresión de esta región B, están localizados cerca del C-terminal del mismo y alejado de la sub-ORF codificante de *TtTrxR5* (Fig. 28A del anexo-II), por lo que no interfieren con esta ORF.

Con respecto al efecto producido por compuestos que originan un estrés oxidativo en la célula (PQ o MD, con tratamientos de 24 ó 2 h, respectivamente), cabe destacar que sólo dos de los genes *TtTrxRs* (*TtTrxR3* y *TtTrxR5*) son inducidos significativamente por PQ; *TtTrxR5* >> *TtTrxR3*. Se ha descrito que el PQ induce estrés oxidativo en todo tipo de organismos y existen

Discusión

numerosas evidencias de la inducción de enzimas antioxidantes como las tiorredoxinas o glutatión reductasas por este compuesto (Prieto-Alamo *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2007; Takizawa *et al.*, 2007; Song and Roe, 2008).

La MD induce significativamente a los genes *TtTrxR1*, *TtTrxR4*, *TtTrxR5* y la denominada región B (posterior a la ORF del *TtTrxR5*, y sin homología con proteínas de función conocida), con valores de inducción similares para todos ellos. El gen *TtTrxR2*, junto con *TtGR1* no son inducidos significativamente por ninguno de los agentes inductores de estrés oxidativo. Por lo tanto, existe un comportamiento igualmente diferencial entre las diferentes versiones de genes *TrxRs* de *T. thermophila*, ya que frente al estrés por metales responden preferentemente *TtTrxR2*, *TtGR1* y *TtTrxR5*, mientras frente a un estrés oxidativo no originado por metales responden preferentemente los genes *TtTrxRs* restantes (incluyendo, de nuevo, al *TtTrxR5*).

El compuesto CDNB (sustrato e inductor de la expresión de genes *GSTs*), también induce significativamente (2 h de tratamiento) la expresión de la mayoría de los genes *TtTrxRs* junto con el *TtGR1* (*TtTrxR2* >> *TtGR1* >> *TtTrxR3* > *TtTrxR1*), a excepción del *TtTrxR4*, *TtTrxR5* y de la región B que no son inducidos por CDNB. Este compuesto es un inhibidor de la actividad TrxR, y no sólo se limita a inactivar la actividad reductasa, si no que induce la producción de superóxido a través de una actividad NADPH oxidasa de la enzima TrxR (Nordberg and Arner, 2001). Igualmente, se ha descrito el incremento en la expresión de genes *TrxRs* (Das *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Nordberg and Arner, 2001) tras tratamiento con CDNB.

Los pH ácidos o básicos no parece que induzcan a ninguno de los genes *TtTrxRs* o al *TtGR1*, incluso el pH 9 disminuye significativamente los niveles de expresión basales tanto para la región B (posterior a la ORF de *TtTrxR5*) como para el gen *TtGR1* (Figuras 74 y 75). Se sabe que la actividad catalítica de las GRs es más sensible a los cambios de pH que la de las TrxRs, debido a que carecen del segundo centro activo (Lacey *et al.*, 2008), sin embargo, aunque se podría alterar la correcta función de la enzima GR, no parece que se induzca la producción de más enzima incrementando la expresión del gen correspondiente.

Como se hizo previamente para otro grupo de genes, podemos llevar a cabo un análisis comparativo de nuestros resultados de RT-PCR cuantitativo para los genes *TtTrxRs* y *TtGR1* con aquellos registrados en genotecas de expresión o micro-matrices (*microarrays*) (Miao *et al.*, 2009), realizados por diferentes autores (Turkewitz, A.P., datos no publicados; Miao *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007; Coyne, R.S. datos no publicados; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene>), y en los que aparecen estos mismos genes de *T. thermophila*. A la hora de comparar debemos tener en cuenta los diferentes parámetros utilizados y su posible o no equiparabilidad, es decir; en las genotecas se usa el número de ESTs (ADNc o transcritos), en el

microarray se usan unidades arbitrarias (UA) y en el RT-PCR cuantitativo utilizamos inducción relativa (o número de transcritos respecto del valor basal o constitutivo). No obstante y aunque existen disparidades, también existen ciertas coincidencias.

Como se muestra en la Tabla 29, la mayoría de los genes *TtTrxRs* junto con el *TtGR1* se han detectado en alguna genoteca, excepto el *TtTrxR3*. En los resultados obtenidos en *microarrays* (Miao *et al.*, 2009), se detecta una baja expresión de este gen *TtTrxR3* (Figura 111). Sin embargo, según nuestros resultados de RT-PCR cuantitativo, este gen se expresa significativamente frente a metales como el Cd^{2+} y As^{5+} (a las 24 h de tratamiento), también responde al PQ y frente al compuesto CDB (Figura 73C). En la genoteca obtenida tras tratamiento con metales (Cd o Cu, ya que el autor no distingue los ESTs obtenidos por Cd de los obtenido por Cu), vemos (Tabla 29) que es el gen *TtTrxR2* el que más aparece (8 ESTs), lo cual coincide con nuestros resultados, siendo este gen el que alcanza valores de inducción más altos con el Cd (2h) (Figura 73B). El *TtGR1*, igualmente es inducido significativamente por Cd^{2+} (24 h) (aunque en menor nivel) y aparecen dos ESTs en la genoteca correspondiente (Tabla 29). Según nuestros resultados otros genes *TtTrxRs* también se expresan significativamente por Cd^{2+} (tales como *TtTrxR1*, *TtTrxR3*, *TtTrxR4*, *TtTrxR5* y *TtGR1*), pero no aparecen en la genoteca de metales (Cd o Cu) (Tabla 29). Una posible explicación podría ser los diferentes tiempos de exposición (1 h frente a 2 ó 24 h), las condiciones de tratamiento (medio de cultivo o tampón), y diferencias en la concentración de metal (44 μM Cd frente a 11 mM Cd).

Gen	Genotecas de expresión						Total
	Estrés químico ¹ (2.753)	Metales pesados ² (3.200)	Conjugación (21.069)	Inanición ³ (19.554)	Crecimiento-División (24.102)	Condiciones no especificadas	
<i>TtTrxR1</i>	1 (0,03)		9 (0,04)	11 (0,05)	157 (0,7)	189	367
<i>TtTrxR2</i>	1 (0,03)	8 (0,25)	1 (0,005)	6 (0,03)	3 (0,01)	2	21
<i>TtTrxR4</i>	1 (0,03)		1 (0,005)	1 (0,005)		1	4
<i>TtTrxR5</i>	2 (0,07)			4 (0,02)			6
<i>TtGR1</i>	1 (0,03)	2 (0,06)		3 (0,02)		1	7
Total	6 (0,19)	10 (0,31)	11 (0,5)	25 (0,125)	160 (0,71)	193	405

¹: diferentes concentraciones de DDT y TBT. ²: Tratamientos con CdCl_2 (11 mM, 1 h) ó CuSO_4 (500 mM, 1 h). ³: Inanición de 1-16 h.

Tabla 29. Aparición de ADNc codificantes de las TrxRs y TtGR1 de *T. thermophila* en diferentes genotecas de expresión (véase texto para más información). Cada cifra indica el número de clones localizados en cada genoteca para cada tipo de gen *TtTrxR* o *TtGR1*, y la cifra entre paréntesis muestra el % en que cada gen aparece en cada genoteca respecto del resto de los genes identificados. El total de clones (ADNc) analizados e identificados en cada genoteca se indica entre paréntesis debajo del nombre de la genoteca.

Volviendo, de nuevo, a la inanición (24 h), a excepción de la región B, ninguno de los genes analizados (*TtTrxRs* y *TtGR1*) se expresan bajo estas condiciones de inanición. Lo cual es contradictorio con los ESTs (correspondientes al gen *TtTrxR5*) obtenidos tras inanición (1-6 h) (Turkewitz, A.P., datos no publicados). Igualmente, como se muestra en la Tabla 29, también para el resto de los genes *TtTrxRs* y el *TtGR1* se han encontrado transcritos en la misma genoteca de expresión obtenida por inanición (1-6 h). El ranking en el número de ESTs encontradas para cada gen es; $TtTrxR1 > TtTrxR2 > TtTrxR5 > TtGR1 > TtTrxR4$. En la conjugación, que se desarrolla en inanición, también es el gen *TtTrxR1* el que más se expresa (con mayor número de ESTs) (Tabla 29). La única explicación que podríamos ofrecer para explicar las diferencias entre estos resultados y los obtenidos en el análisis por RT-PCR cuantitativo son los diferentes tiempos de exposición a inanición, cortos (1-6 h) en las genotecas y más prolongados en el PCR cuantitativo (24 h). En el análisis de expresión utilizando un *microarray* a lo largo de diferentes tiempos de inanición (3-24 h) (Figura 111) (Miao *et al.*, 2009), se detecta una única expresión (que suponemos significativa) del gen *TtTrxR1* que mantiene unos niveles similares de expresión durante todo el proceso de inanición, con valores en UA menores que los que presenta este gen en el ciclo crecimiento-división (Figura 111A y B). El resto de los genes (según el *microarray*) parece que se expresan poco a lo largo de las hasta 24 h de inanición (Figura 111B), lo cual en gran parte coincide con nuestros resultados por RT-PCR cuantitativo (24 h de inanición), a excepción únicamente del gen *TtTrxR1* del que no se detecta inducción de la expresión en nuestro análisis. Los resultados del *microarray* (Figura 111B), igualmente no coinciden completamente con los de la genoteca de expresión (1-6 h) (Tabla 29), ya que la diferencia entre 11 ESTs del gen *TtTrxR1* y los 3-6 ESTs de otros no parece ser tan grande como la que se indica en UA para el *TtTrxR1* y el resto de genes considerados.

Según el *microarray* (Figura 111), es el gen *TtTrxR1* el que más se expresa en las tres condiciones analizadas (crecimiento, inanición y conjugación) respecto del resto. Esto coincide con lo encontrado en las diferentes genotecas, en donde un total de 367 ESTs corresponden al gen *TtTrxR1* (Tabla 29), lo cual parece ser debido principalmente a sus niveles de expresión en condiciones de crecimiento división (157 ESTs) y condiciones no especificadas (189 ESTs).

Según los datos de coexpresión en condiciones de crecimiento, conjugación o inanición (Miao *et al.*, 2009), estos genes no coexpresan entre ellos, sin embargo como muestran los resultados por RT-PCR cuantitativo hay varios genes *TtTrxRs* que responden con niveles considerables de inducción frente a metales u otros agentes estresantes, por ejemplo; los genes *TtTrxR2* y *TtTrxR5* frente al estrés por As^{5+} (Figuras 73B y 74B), por lo que probablemente ambos genes coexpresen bajo estas condiciones de estrés. Y lo mismo sucedería para otros genes *TtTrxRs* en condiciones de estrés específicas.

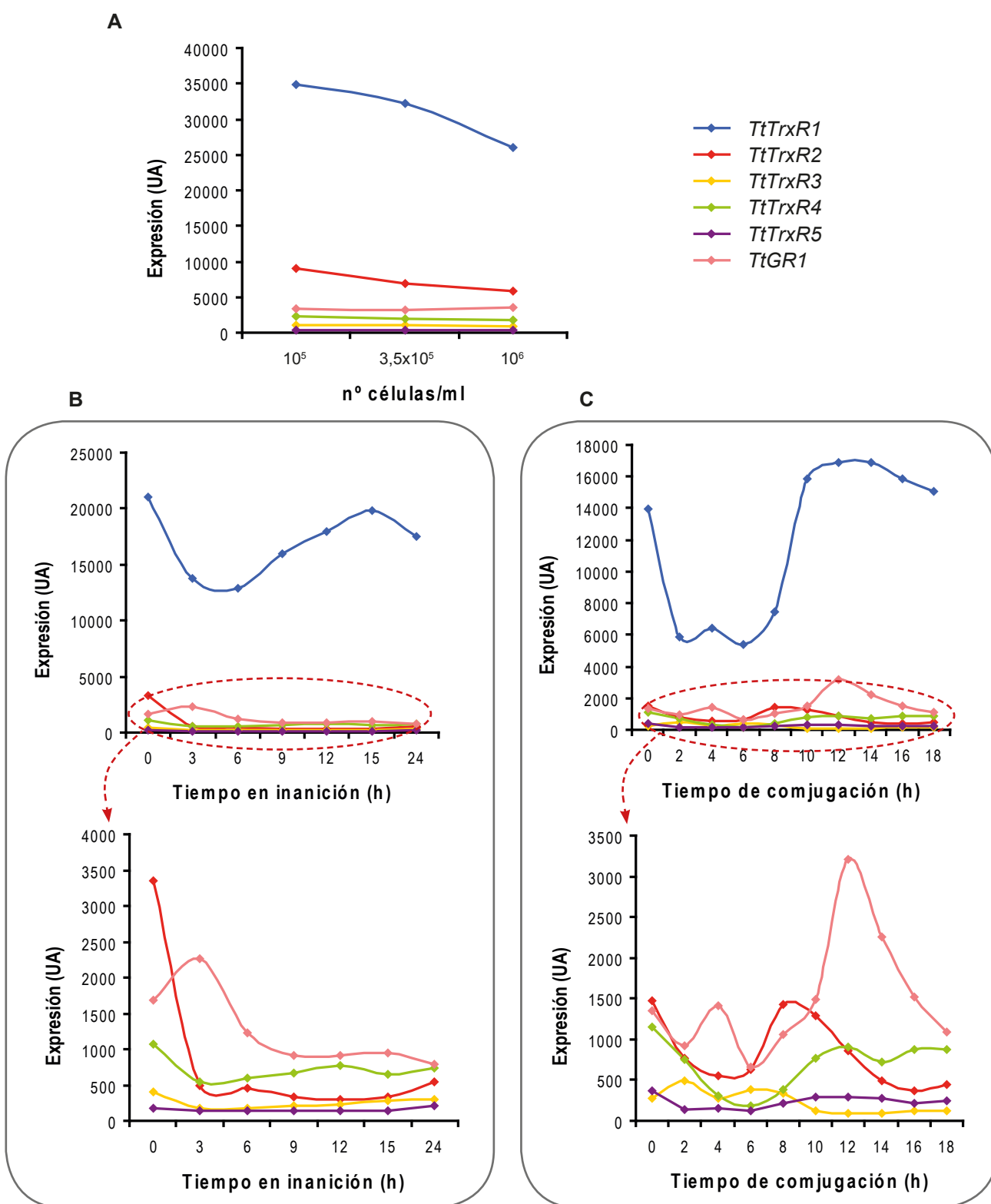


Figura 111. Niveles de expresión (unidades arbitrarias) de los genes *TtTrxRs* que se han detectados en diferentes condiciones utilizando un *microarray* (Miao *et al.*, 2009). A: tres fases (con número de células creciente) del ciclo crecimiento-división. B: a diferentes tiempos de inanición (0-24 h) y C: en diferentes fases de la conjugación (0-18 h). UA : unidades arbitrarias. Se representan gráficas en diferentes escalas.

Discusión

Como se puede apreciar en el resumen de la Tabla 30, los genes *TtTrxR1* (selenoproteína) y *TtTrxR2* (no selenoproteína) (con ~ 60 % de identidad entre ellos, y ambos de expresión temprana) son los que más frecuentemente se expresan en condiciones que podemos considerar más habituales (crecimiento, conjugación e inanición) para un protozoo ciliado, sin embargo en estrés por metales (condiciones menos habituales) son los genes *TtTrxR2* y *TtTrxR5* (ambos no son selenoproteínas, con ~ 72 % de identidad y de expresión temprana) los que destacan. *TtTrxR5* y *TtTrxR2* también destacan en condiciones de estrés oxidativo y tratamiento con CDNB, respectivamente (Tabla 30). En general, el que menos se expresa es el gen *TtTrxR3* (selenoproteína y gen de expresión tardía) (~58 % identidad con *TtTrxR4* y 46-47 % con *TtTrxR1* y *TtTrxR2*). El gen *TtGR1* se expresa preferentemente en condiciones de estrés por As^{5+} y Pb^{2+} , aunque también aparece en estrés por Cd^{2+} y CDNB (Tabla 30).

Condiciones	Ranking del nivel de expresión	Método de detección
Crecimiento	<i>TtTrxR1</i> >> <i>TtTrxR2</i> > otros	Genoteca de expresión Microarray
Conjugación	<i>TtTrxR1</i> > <i>TtTrxR2</i> ~ <i>TtTrxR4</i> ≥ otros	Genoteca de expresión Microarray
Inanición	<i>TtTrxR1</i> > <i>TtTrxR2</i> > <i>TtTrxR5</i> > <i>TtGR1</i> > <i>TtTrxR4</i>	Genoteca de expresión
Exposición a Cd^{2+}	<i>TtTrxR2</i> > <i>TtTrxR5</i> > <i>TtTrxR3</i> ≥ <i>TtGR1</i> > <i>TtTrxR1</i> ~ <i>TtTrxR4</i>	RT-PCR cuantitativo
	<i>TtTrxR2</i> > <i>TtGR1</i>	Genoteca de expresión
Exposición a As^{5+}	<i>TtGR1</i> >> <i>TtTrxR2</i> >> <i>TtTrxR5</i> > <i>TtTrxR1</i> > <i>TtTrxR4</i> ≥ <i>TtTrxR3</i>	RT-PCR cuantitativo
Exposición a Pb^{2+}	<i>TtGR1</i> >> <i>TtTrxR1</i> ~ <i>TtTrxR2</i>	RT-PCR cuantitativo
Exposición a Cu^{2+}	<i>TtTrxR2</i> > <i>TtTrxR5</i>	RT-PCR cuantitativo
Exposición a Zn^{2+}	<i>TtTrxR5</i>	RT-PCR cuantitativo
Estrés oxidativo: PQ /MD	<i>TtTrxR2</i> >> <i>TtTrxR3</i> / <i>TtTrxR1</i> ~ <i>TtTrxR4</i> ~ <i>TtTrxR5</i>	RT-PCR cuantitativo
Exposición a CDNB	<i>TtTrxR2</i> >> <i>TtGR1</i> >> <i>TtTrxR3</i> > <i>TtTrxR1</i>	RT-PCR cuantitativo

Tabla 30. Comparación de niveles de expresión de genes *TtTrxRs* y *TtGR1* obtenidos por diferentes métodos, independientemente del tipo de tratamiento y condiciones usadas en cada análisis.

En cualquier caso, parece que existe un comportamiento de expresión diferencial para estos genes, dependiente de las condiciones ambientales. Debido a los % de identidad entre algunos de ellos, podríamos considerarlos, al igual que algunas GSTs como ecoparálogos (Sánchez-Pérez *et al.*, 2008), con funciones destacadas uno sobre otros dependiendo del ambiente.

6. GENES SIMILARES A TRIPANOTIÓN (TryS) O GLUTATIONILESPERMIDINA (GspS) SINTETASAS EN *Tetrahymena thermophila*

La mayoría de los organismos eucariotas y procariotas mantienen la homeostasis intracelular redox tiólica gracias a dos sistemas; el sistema basado en el glutatión GSH/GR y el sistema basado en la tioredoxina Trx/TrxR. Existen otros sistemas minoritarios alternativos, como el descubierto originalmente en tripanosomátidos, que es el sistema basado en el tripanotión T[SH]₂/TryR. Este sistema consiste en la síntesis de un ditiol de baja masa molecular (bis(glutationil)-espermidina) o tripanotión (T[SH]₂) (dos moléculas de glutatión unidas a la poliamina espermidina) (Irigoien *et al.*, 2008). La biosíntesis se da en dos etapas (GSH + espermidina → glutationileespermidina (Gsp) + GSH → T[SH]₂) con gasto de ATP en ambas. Las dos etapas pueden ser catalizadas por enzimas diferentes GspS y TryS, respectivamente. Aunque, también pueden ser catalizadas por una única enzima; la TryS (con ambas capacidades biosintéticas). Algunos tripanosomátidos presentan esta única enzima, mientras que otros presentan ambas enzimas (Tabla 31). Independientemente de su actividad sintetasa (localizada en el C-terminal), ambas TryS y GspS tiene además una función antagónica T[SH]₂/Gsp-amidasa (localizada en un dominio N-terminal), que hidroliza el T[SH]₂ y/o la Gsp a GSH y espermidina como productos finales. Por lo tanto, en todos los tripanosomátidos estudiados y en otros organismos (procariotas y eucariotas) con genes homólogos a TryS o GspS, ambas enzimas presentan ambos dominios (sintetasa + amidasa) en la misma molécula (Tabla 31).

En el genoma macronuclear de *Tetrahymena thermophila* hemos localizado 4 genes con cierta similitud con GspS/TryS de otros microorganismos procariotas o eucariotas. En general, estos genes se encuentran en monocopia, como el caso del gen *TcTryS* en *Trypanosoma cruzi* (Irigoien *et al.*, 2008), por lo que las 4 versiones presentes en *T. thermophila* parece una excepción ligada al carácter poli-isogénico (familias génicas) presente habitualmente en el genoma macronuclear de ciliados. Estos 4 genes codifican para presumibles GspS, ya que el análisis *in silico* revela una mayor similitud con GspS, principalmente con GspS de bacterias. TtGspS2, TtGspS3 y TtGspS4 presentan su más alta identidad con una GspS de la proteobacteria *Ralstonia eutropha* (27, 28 y 30 %, respectivamente). Igualmente, el ciliado parásito *Ichthyophthirius multifiliis* tiene una TryS (EGR29718), que presenta porcentajes de identidad similares (36 %) a una GspS de la proteobacteria *Pseudoalteromonas tunicata* y a la TryS de *Trypanosoma brucei*. La TtGspS1, a diferencia de las otras tres potenciales GspS de *T. thermophila*, tiene un 37 % de identidad con la TryS del tripanosomátido *Crithidia fasciculata* (CfTryS).

Microorganismo	Sistema Antioxidante (REDOX)				Dominios TryS/GspS			Ciclo biológico		Referencia
	GSH/GR	T[SH] ₂ / TryR	Trx/TrxR	TryS	GspS	Amidasa	Sintetasa	Parásito	Libre	
<i>Trypanosoma brucei</i>	- / -	+ / +	+ / -	+	-	+	+	+	-	Krauth-Siegel & Comini, 2008.
<i>Trypanosoma cruzi</i>	- / -	+ / +	+ / -	+	+	+	+	+	-	Krauth-Siegel & Comini, 2008.
<i>Leishmania major</i>	- / -	+ / +	+ / -	+	+	+	+	+	-	Oza et al., 2005.
<i>Crithidia fasciculata</i>	- / -	+ / +	?	+ (6)	+	+	+	+	-	Smith et al., 1992
<i>Euglena gracilis</i>	+ / +	? / +	+ / (1)	?	+	?	?	-	+	Montrichard et al., 1999
<i>Entamoeba histolytica</i>	+ / +	+ / +	+ / +	?	?	?	?	+	+	Ondarza et al., 1997 Tamayo et al., 2005
<i>Naegleria fowleri</i>	+ / +	+ / (2)	?	?	?	?	?	+	+	Ondarza et al., 2006
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	+ / +	?	+ / +	(3)	+	+	+	+	+	Ichthyophthirius Genome Database Wiki.
<i>Tetrahymena thermophila</i>	+ / +	+ / (4)	+ / +	-	+	-	+	(7)	+	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>	+ / +	- / -	+ / +	-	+	+	+	(5)	+	Bollinger et al., 1995
<i>Bombus impatiens</i>	+ / +	?	+ / +	-	+	+	+	-	+	XP_003494803

(1): No se ha detectado actividad TrxR usando DTNB como sustrato, mientras que otros autores han indicado su presencia. (2): Se ha detectado actividad TryR. (3): El gen (EGR29718) ha sido identificado como TryS, pero presenta mayor similitud con GspS. (4): Presenta actividad TryR. (5): Aunque no se le puede considerar un parásito *sensu stricto*, se considera como un potencial patógeno. (6): Al igual que la TryS de *T. brucei*, la TryS de *C. fasciculata* tiene la capacidad de biosintetizar T[SH]₂ sin necesitar la GspS (Comini et al., 2005). (7): Algunas especies son parásitas facultativas (como *T. rostrata*).

Tabla 31. Sistemas antioxidantes presentes en protozoos y otros organismos, presencia de dominios amidasa/sintetasa en TrySs y/o GspSs y estado preferente en su ciclo biológico. Los colores indican los diferentes filos: Rosa: Euglenozoa, Marrón: Amoebozoa, Morado: Heterolobosa, Azul: Alveolata, Verde: Proteobacteria, Amarillo: Artrópodos.

En general, entre ambas enzimas hay cierto grado de similitud, así por ejemplo; la TcTryS (*Trypanosoma cruzi*) muestra un 46 y un 51 % de similitud con la CfGspS (*Crithidia fasciculata*) y la EcGspS (*E. coli*), respectivamente.

El análisis de la estructura 3D inferida de las secuencias aminoacídicas, también ha confirmado la mayor similitud de 3 de las 4 TtGspS con GspS bacterianas bifuncionales (EcGspS), excepto la TtGspS1 que, de nuevo, las 4 α -hélices de su región sintetasa truncada (que comprende 98 residuos) encuentran una mayor similitud estructural con la región sintetasa correspondiente a la TryS del tripanosomátido *Leishmania major* (LmTryS). Las semejanzas encontradas entre las diferentes TtGspSs y otras GspS o TryS de otros organismos residen exclusivamente en el dominio sintetasa, ya que ninguna de ellas tienen el dominio amidasa. Esta peculiaridad (presencia de sólo dominio sintetasa) es exclusiva de las TtGspSs, ya que el resto de los organismos analizados con genes homólogos a TryS o GspS presentan siempre ambos dominios (Tabla 31). Es precisamente el dominio amidasa el que conserva mayor similitud entre los diferentes organismos que lo presentan (Oza et al., 2002b). Estudios *in vitro* en *L. major* han demostrado que el dominio sintetasa en solitario es funcionalmente activo sin necesidad del dominio amidasa (Oza et al., 2006). Se ha especulado sobre las posibles funciones del dominio amidasa de estas enzimas bifuncionales y la cuestión sigue abierta. En un principio, se creía que era una forma de liberar espermidina y de este modo controlar los niveles intracelulares de poliaminas (Oza et al., 2002b). Esta idea se ha ido modificando, y actualmente se defiende la teoría que el dominio amidasa actúa como un regulador de la actividad sintetasa (Fyfe et al., 2008), al descubrirse que cuando se carece de este dominio se produce mayor cantidad de tripanotión (Oza et al., 2006) y que tripanosomátidos cuyas TrySs tienen bloqueado el dominio amidasa son más resistentes a estrés oxidativo (Wyllie et al., 2009). Por lo tanto, al menos en tripanosomátidos, el dominio amidasa no es esencial como lo es el dominio sintetasa para la viabilidad del protozoo parásito, como se ha comprobado en *T. brucei* (Wyllie et al., 2009). No conocemos si en *T. thermophila* estos genes *TtGspSs/TtTrySs* son necesarios o no para la viabilidad de este microorganismo, ya que de momento no se han construido cepas *knockout* de ninguno de ellos. Por otro lado, estos genes no tienen el dominio amidasa, lo que no es absolutamente necesario para la actividad sintetasa, la cual sería la única que podría funcionar en estas proteínas.

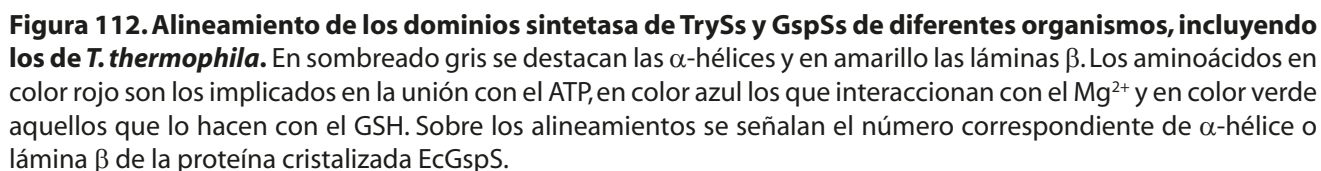
Actualmente, existe una única estructura tridimensional para las TrySs/GspSs que corresponde a la proteína cristalizada GspS de *E. coli* (EcGspS), y es con la que presentan la máxima similitud estructural la mayoría de las TtGspSs. A partir de esta estructura y utilizando un software de análisis de estructuras secundarias de proteínas (PSIPRED v3.0), hemos realizado un análisis comparativo entre las proteínas TtGspSs y otras TrySs y GspSs, tanto eucariotas como proca-

riotas, con el fin de dilucidar la potencial funcionalidad del dominio sintetasa de las *TtGspSs* (Figura 112). Como se aprecia en dicha figura, las estructuras secundarias inferidas son bastante semejantes al resto de las proteínas *TrySs/GspSs* con las que se comparan, con la diferencia de 2 α -hélices ($\alpha 12$ y $\alpha 13$) y 2 láminas β ($\beta 20$ y $\beta 21$) que están ausentes en todas las *TtGspSs*, aunque presentes en el resto de las moléculas utilizadas en la comparación. En la proteína *EcGspS* estas regiones se disponen en la zona periférica y no interaccionan con el mecanismo de catálisis (Pai *et al.*, 2006). Con respecto a los residuos aminoacídicos que intervienen en la catálisis (Figura 112), las *TtGspS2*, 3 y 4 presentan al igual que el resto de *TrySs/GspSs* los aminoácidos que interaccionan con el ATP (4 residuos marcados en rojo), los que lo hacen con el Mg^{2+} (3 residuos marcados en azul) y los que interaccionan con el GSH (3 residuos marcados en verde), con la excepción de la *TtGspS1* que sólo presenta 2 de los 3 residuos que interaccionan con el Mg^{2+} , por lo que no podría interaccionar ni con el ATP ni con el GSH. De ello, se podría inferir que la *TtGspS1* (con el dominio sintetasa truncado) no podría sintetizar tripanotión, por lo tanto sólo el resto de las moléculas (*TtGspS2*, 3 y 4) potencialmente podría sintetizar tripanotión.

Otra peculiaridad de los genes *TtGspSs* es la presencia de un dominio von Willebrand en el gen *TtGspS4*. Este dominio tiene una elevada similitud (79 % de identidad, $E = 0,0$) con otra proteína del mismo ciliado *T. thermophila* que contiene un dominio von Willebrand factor tipo A (vWA). Desde su descubrimiento, este dominio ha despertado mucho interés debido a su amplia presencia en muchas proteínas y la gran variedad de funciones celulares en el que potencialmente está involucrado, como por ejemplo; formación de membranas, migración celular, diferenciación celular, adhesión, señalización celular, estabilidad cromosómica, formación de complejos multi-proteicos, etc. (Whittaker and Hynes, 2002). Existen diferentes superficies de interacción de este dominio, y en muchos casos la unión con el ligando está mediada por la presencia de un ión metálico (motivo MIDAS). En el protozoo parásito *Plasmodium falciparum*, se ha comprobado que existe un incremento de proteínas que contienen estos dominios von Willebrand en el momento de la infección, explicando su funcionalidad como un mecanismo de adhesión (Bridges *et al.*, 2010).

6.1 Sobre la expresión de los genes *TtGspSs*

De los cuatro posibles genes *TtGspSs* se descartó el *TtGspS1* para el análisis de su expresión, debido a que su dominio sintetasa está truncado y le faltan aminoácidos esenciales para la catálisis, como se ha indicado previamente, y por lo que probablemente no sea funcional. Además, la ORF completa del *TtGspS3* y gran parte (incluyendo el dominio sintetasa) del gen *TtGspS4* presentan una elevada homología (93 %, y ambos genes se localizan en el mismo brazo



cromosómico a ~3 Kb de distancia), por lo que se descartó diseñar cebadores para el *TtGspS3*, y sólo se diseñaron cebadores de la región von Willebrand exclusiva del *TtGspS4*. Por lo tanto, se pudieron analizar dos genes; *TtGspS2* (con un producto semejante al *TtGspS1*, 57 % identidad) y *TtGspS4* (con un producto semejante al *TtGspS3*, 86 % identidad).

Los resultados obtenidos del análisis por RT-PCR cuantitativa muestran que; el gen *TtGspS2* se mantiene sin inducirse su expresión en las condiciones estrés ensayadas, a excepción del tratamiento con Zn^{2+} (24 h) en donde se incrementa su expresión unas 4 veces respecto del control. Por el contrario, el gen *TtGspS4* se induce por algunos metales pesados (Cu^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+}), por PQ y principalmente (~ 200 veces) por CDNB (sustrato e inductor de enzimas GSTs).

A pesar de la escasez de estudios que relacionen el $T[SH]_2$ y/o las enzimas involucradas en su síntesis con el estrés producido por metales, podemos llevar a cabo cierto análisis comparativo. Varios estudios han puesto de manifiesto que una amplificación génica diferencial de algunas de las enzimas implicadas en el metabolismo del tripanotión (confieren resistencia a metales y frente a determinadas drogas en parásitos como *Leishmania*) (Mary *et al.*, 2010; Guimond *et al.*, 2003). Igualmente, se ha comprobado en *Leishmania* que un incremento en tripanotión induce resistencia a antimonio y a arsénico (Mukhopadhyay *et al.*, 1996), y la resistencia a antimonio está ligada a amplificación génica diferencial de genes como la GCL (γ -glutamylcisteína ligasa, involucrada en la síntesis de GSH) y la TryR (tripanotión reductasa, involucrada en la reducción del tripanotión) (Jeddi *et al.*, 2011).

En un trabajo más reciente (Alcolea *et al.*, 2011), se analiza la expresión diferencial, frente a 1 mM de acetato de cadmio, del genoma de *Leishmania infantum* mediante un *microarray*. En estas condiciones, uno de los genes que se induce (~6 veces respecto del control) es el gen de la tripanotión reductasa (TryR), mientras que no se detecta sobreexpresión de los genes encargados de la síntesis del tripanotión.

Entre las genotecas de expresión de *T. thermophila* disponibles, de los 4 genes *TtGspSs*, hemos localizado únicamente 3 clones del gen *TtGspS4* en una genoteca obtenida durante la conjugación (Turkewitz, datos no publicados). Curiosamente, estos 3 clones se identifican con la zona del dominio von Willebrand de dicho gen y ninguno de ellos con la región de homología con proteínas TrySs.

Los datos obtenidos de los experimentos de expresión utilizando un *microarray* de *T. thermophila* (Miao *et al.*, 2009), revelan (Figura 113) que durante el crecimiento celular es el gen *TtGspS2* el que se expresa de manera constante, con niveles de expresión muy por encima de los del resto de los genes (Figura 113A). Con niveles de expresión menores, son los genes

TtGspS4 y *TtGspS2* los que más se expresan durante la inanición (Figura 113B), y durante la conjugación (que se realiza en inanición) (Figura 113C) es el gen *TtGspS4* el que incrementa su expresión tanto al principio como al final del proceso conjugativo (lo que coincide con lo encontrado en la genoteca obtenida por Turkewtiz). De ambos estudios, se podría inferir, en general, que el orden de niveles de expresión entre los 4 genes *TtGspSs* es; *TtGspS4* > *TtGspS2* >> *TtGspS3* = *TtGspS1*, con la excepción del *TtGspS2* que se expresa más que el *TtGspS4* durante el crecimiento.

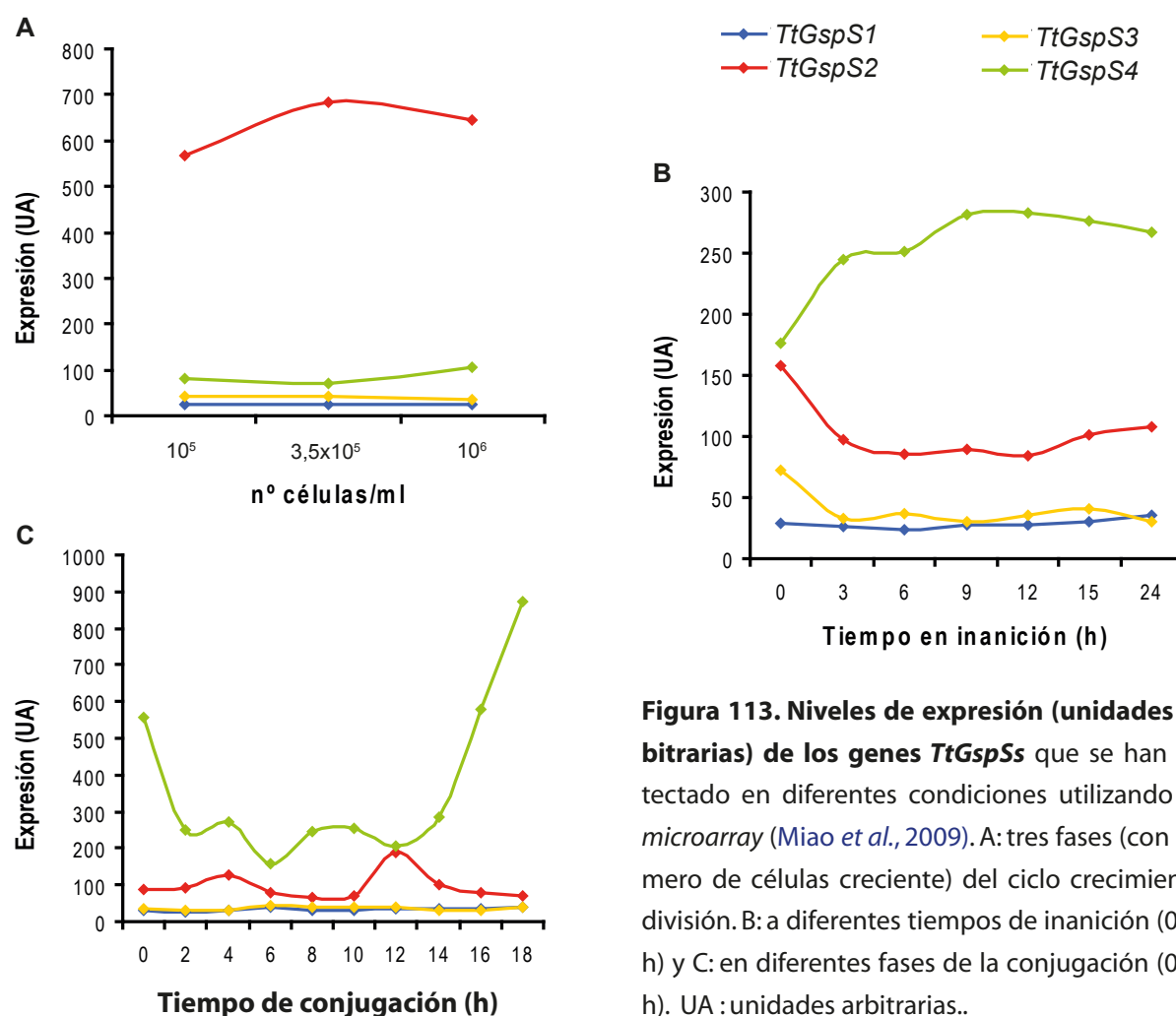


Figura 113. Niveles de expresión (unidades arbitrarias) de los genes *TtGspSs* que se han detectado en diferentes condiciones utilizando un microarray (Miao *et al.*, 2009). A: tres fases (con número de células creciente) del ciclo crecimiento-división. B: a diferentes tiempos de inanición (0-24 h) y C: en diferentes fases de la conjugación (0-18 h). UA : unidades arbitrarias..

Comparando estos resultados con los obtenidos en este trabajo por RT-PCR cuantitativa, podemos concluir que el gen *TtGspS2* se expresa principalmente en condiciones de ausencia de estrés celular, aunque se expresa ligeramente tras una prolongada exposición al Zn²⁺ (el zinc es un metal esencial y se conoce que actúa como cofactor en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno mediadas por tripanotión (Chauhan *et al.*, 2008)). Mientras que el gen *Tt-*

GspS4 se expresa principalmente en condiciones de estrés (inanición, metales pesados, estrés oxidativo, etc). En el resto de genes (*TtGspS3* y *TtGspS1*), sus expresiones son poco significativas o nulas.

6.2 Presencia y biosíntesis de T[SH]₂ en *T. thermophila*.

El análisis de la presencia de tripanotión (T[SH]₂) y/o actividad tripanotión sintetasa (TryS) en extractos celulares derivados del ciliado *T. thermophila*, ha mostrado la presencia de GSH (~122 pmoles/5 µl), Gsp (57 pmoles/5 µl) y T[SH]₂ (78 pmoles/5 µl). Igualmente, la inactivación por calor de las potenciales actividades enzimáticas presentes en el extracto celular, incrementa la presencia de GSH (217 pmoles/5 µl) al no utilizarse para su conversión en Gsp o T[SH]₂, y disminuye las cantidades de Gsp (~24 pmoles/5 µl) y T[SH]₂ (29 pmoles/5 µl).

Los perfiles de estas moléculas a lo largo de la curva de crecimiento de este ciliado muestran que existe un incremento del GSH y T[SH]₂ intracelular al inicio de la fase exponencial, y estos valores se mantienen estables durante el resto de la fase exponencial y la estacionaria. En cualquier caso, los niveles de estas tres moléculas, sea cual sea la fase de crecimiento, mantienen el siguiente orden; GSH > T[SH]₂ > Gsp. Lo que podría indicarnos que los productos inicial (GSH) y final (tripanotión) suelen estar en mayor cantidad que el intermedio o transitorio (Gsp). Indicando, igualmente, la relevancia de estas moléculas tiólicas en el mantenimiento de la homeostasis intracelular redox.

Los niveles de tripanotión son muy variables en función del organismo, la fase de crecimiento en que se encuentre y el medio en el que esté el organismo. Así, por ejemplo, en *C. fasciculata* los niveles más altos de T[SH]₂ se alcanzan en la fase exponencial tardía, mientras que en *T. cruzi* esto ocurre al comienzo de la fase exponencial. La disminución de los niveles de tripanotión en la fase estacionaria es una tendencia que se presenta en todo el grupo de tripanosomátidos en donde se ha analizado (Ariyanayagam and Fairlamb, 2001). En *T. thermophila* el comportamiento de los niveles de tripanotión es más similar al que presenta *T. cruzi*, es decir; los niveles más altos de tripanotión se detectan al inicio de la fase exponencial, para luego ir disminuyendo a lo largo de la fase estacionaria.

En *Naegleria fowleri*, ameba monopodial de vida libre, en el que también se analiza la cantidad de tripanotión por HPLC a lo largo de la curva de crecimiento de la ameba, el pico más elevado se detecta a las 60 horas de cultivo, lo que corresponde con el final de la fase exponencial, como ocurre en *C. fasciculata* (Ondarza et al., 2003).

Tanto en *T. cruzi* (Ariyanayagam and Fairlamb, 2001) como en *T. thermophila* los niveles de GSH libre son más elevados que los de T[SH]₂, dato que podría corroborar la posible función de almacenamiento de GSH por parte del tripanotión, al menos en el caso de *T. cruzi*, pero no en el de *T. thermophila*, ya que las posibles enzimas TtGspSs/TtTrySs de este microorganismo no tienen la función amidasa (necesaria para hidrolizar el tripanotión), sólo la sintetasa. En *T. thermophila* parece estar favorecida una mayor presencia y probablemente mayor funcionalidad del sistema GSH/GR frente al sistema T[SH]₂/TryR.

Al igual que en los experimentos de expresión de los genes *TtGspSs* bajo diferentes condiciones de estrés, también se llevaron a cabo medidas de T[SH]₂ en extractos celulares de poblaciones de *T. thermophila* previamente tratadas (durante 2 h) con los mismos agentes estresantes. El tratamiento con Cu²⁺ es el que corresponde con los niveles más elevados de T[SH]₂ intracelular (~7 veces respecto del control), mientras que el tratamiento con Zn²⁺ corresponde con una cantidad de T[SH]₂ aproximadamente 2 veces la del control, y, por último, el tratamiento con CDNB mantiene los mismos niveles de tripanotión que los del control. Si relacionamos estos datos con los niveles de expresión del gen *TtGspS4* (principal gen *TtGspS* que se expresa en condiciones de estrés), vemos que a las 2 h el ranking de niveles de expresión es CDNB >> Cu²⁺ >> Zn²⁺, aunque a las 24 h es Zn²⁺ > Cu²⁺. Parece que el CDNB demande mayor cantidad de T[SH]₂, de aquí que se exprese más el gen *TtGspS4* y se gaste más T[SH]₂, mientras que el Cu²⁺ demanda menos expresándose menos el mismo gen, gastando menos y acumulando más T[SH]₂. Existen pocos trabajos que relacionen cantidad celular de T[SH]₂ con la presencia de metales, no obstante se conoce un estudio en el que cepas resistentes al arsénico de *Leishmania tarentolae* muestran un incremento del orden 10-30 veces los niveles de tripanotión respecto a la cepa salvaje, mientras que los niveles de GSH sufren un incremento de 2-5 veces (Mukhopadhyay et al., 1996). En *T. thermophila* el arsénico (ión arseniato) no parece que induzca ningún gen *TtGspSs* de los estudiados, aunque no conocemos las cantidades intracelulares de T[SH]₂ bajo la exposición a este metal.

La existencia de tripanotión en *T. thermophila* se ha comprobado tanto por HPLC como por espectrometría de masas. Sin embargo, los genes encontrados en este ciliado se asemejan más a GspS (aunque secundariamente pueden encontrar cierta similitud con TryS). Por lo que podríamos suponer que, al igual que en algunos tripanosomátidos (Tabla 31) sólo existe una enzima (denominada como TryS) que puede catalizar ambos pasos en la biosíntesis del tripanotión (GSH + espermidina → glutationilespermidina (Gsp) + GSH → T[SH]₂), en *T. thermophila* podría, igualmente, existir una única enzima (más similar a GspS) que pudiera catalizar ambos pasos en la biosíntesis del T[SH]₂ (Figura 114).

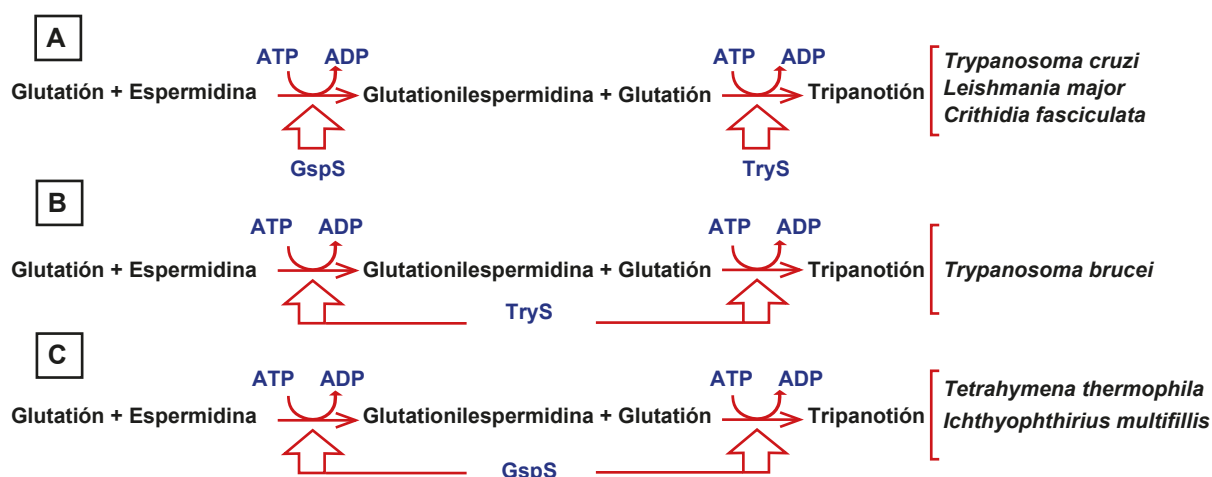


Figura 114. Esquema que muestra las diferentes posibilidades reales (A y B) e hipotéticas (C) para biosintetizar tripanotión . (A): Biosíntesis de T[SH]₂ por medio de dos enzimas (GspS y TryS). *Crithidia fasciculata* puede usar sólo la TryS para catalizar las dos fases (como en el modelo B). (B): Biosíntesis de T[SH]₂ por medio de una sola enzima (TryS) que cataliza ambas reacciones. (C): Hipótesis sobre la biosíntesis de T[SH]₂ por medio de una sólo enzima (GspS) que podría catalizar ambas reacciones.

La presencia de T[SH]₂ en *T. thermophila* está también avalada por el hecho de que en su genoma-macronuclear existen al menos 2 genes (que hemos denominado *TtTryX1* y *TtTryX2*) que codifican proteínas de la familia de las triparredoxinas (TryX). Estas proteínas (con función similar a la superfamilia de las tioredoxinas, dentro de las oxidorreductasas) constituyen parte del sistema enzimático ligado al T[SH]₂, y están involucradas en el transporte de poder reductor usando el tripanotión como donador. Ambas proteínas (*TtTryX1* y *TtTryX2*) presentan un dominio triparredoxina (TryX), que incluye el motivo conservado (característico de las TryX) WCPPC en su centro catalítico, que reemplaza al motivo WCG/APG que se encuentra en las tioredoxinas (Colotti and Ilari, 2011). En la Figura 115, se muestra el alineamiento de una parte del dominio TryX que contiene el motivo conservado (sombreado en azul) de ambas proteínas de *T. thermophila* con las TryXs de otros organismos. Igualmente, en la misma figura, se muestra el árbol obtenido a partir de las mismas secuencias utilizadas en el alineamiento.

En *Leishmania infantum* (Colotti and Ilari, 2011), también se han identificado dos genes (en monocopia) que codifican TryXs activas. Las secuencias aminoácidas inferidas de *TtTryX1* y *TtTryX2* presentan similitudes con TryX del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (~48%, $E = 6e^{-20}$) y una nucleoredoxina (un miembro de la familia de las tioredoxinas, más similar a TryX) del salmón común (*Salmo salar*) (~92 %, $E = 2e^{-26}$), respectivamente. Ambos genes *TtTryXs* se expresan (según los datos obtenidos de los experimentos de expresión utilizando un *microarray* de *T. thermophila* (Miao et al., 2009); el *TtTryX1* durante el ciclo crecimiento-división, mientras que el *TtTryX2* se expresa preferentemente durante el estrés por inanición (3-6 h).

TtTryX2	DV-SPLKTNKVTCLYFSASYC PPC QAFTPLLIDFYNEVNAE-----DK
TtTryX1	DQ-DLFEANDIVCLYFAASHCY PS KAFTPKLIEFYNEVNIEDINIENKK
TbTryX	SL-GSLV-GKTVFLYFSASWC PPC RGFTPLAEFYEKH-----HVAK
LdTryX	DM-SSLS-GKTVFLYFSASWC PPC RGFTPKLVEFYEKH-----HNSK
SsTryX	DI-SSLE-GHYVGVIYFSAHWC PPC RSLTRVLVESYRTVKES-----GQ
HsTryX	ES-SSLE-GSHVGVIYFSAHWC PPC RSLTRVLVESYRKIKEA-----GQ
MmTryX	ES-SSLE-GSHVGVIYFSAHWC PPC RSLTRVLVESYRKIKEA-----GQ
GgTryX	DPEEALQ-NKVVGLYFSAGWC SPC RDFTPVLCDFYTDLLEE----CQPPA
MtTryX	PV-ASLV-GKTIGLYFSAGWC VP CTKFTPKLINVYQIIKQELAEKQDPHE

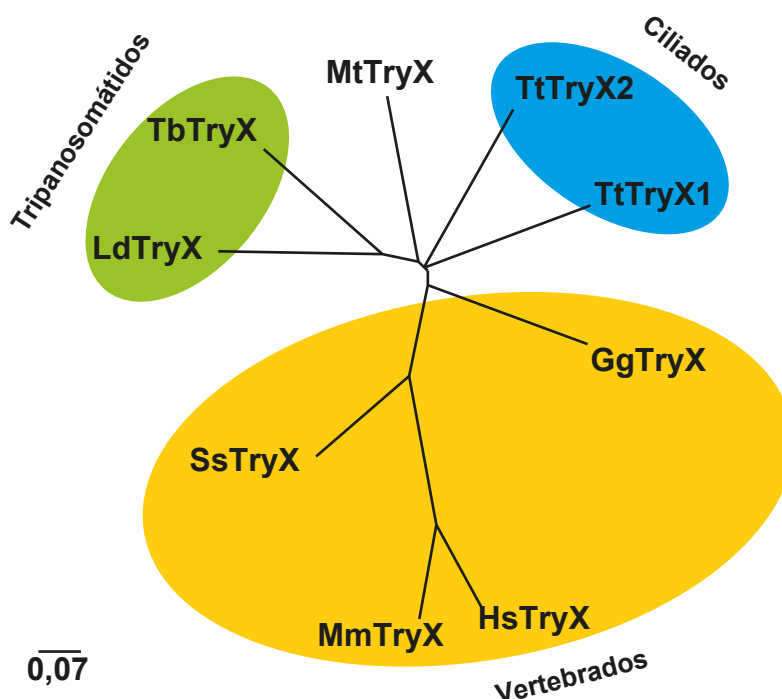


Figura 115. Parte superior: **alineamiento (Clustal W) de la región catalítica del dominio TryX de algunos organismos** (incluyendo a las dos de *T. thermophila*). En azul se indica el motivo (WCPPC) conservado en las TryX, y en gris los aminoácidos idénticos. Parte inferior: **árbol filogenético inferido de las secuencias aminoacídicas TryX** alineadas por el método T-Coffee. TtTryX1/2 (*T. thermophila*), TbTryX (*Trypanosoma brucei*), LdTryX (*Leishmania donovani*), MtTryX (*Medicago truncatula*), GgTryX (*Gallus gallus*), SsTryX (*Salmo salar*), MmTryX (*Mus musculus*), HsTryX (*Homo sapiens*). La barra indica el número de sustituciones/sitio

Otro elemento que ratifica la presencia de $T[SH]_2$ en *T. thermophila* es la existencia de la capacidad de ser reducido por una actividad tripanotión reductasa (TryR). La TryR es una enzima esencial en tripanosomátidos, de hecho se utiliza como molécula-diana en quimioterapia (Krauth-Siegel and Inhoff, 2003). Nuestros resultados han mostrado que en *T. thermophila* existe actividad similar a TryR ($T(S)_2 \rightarrow T[SH]_2$), aunque comparada con la actividad GR es considerablemente menor (60 vs 20 nmol/min/mg de proteína). Igualmente, ambas actividades reductasas se incrementan en presencia de diferentes metales (Cu^{2+} y Zn^{2+}), los mismos metales (fundamentalmente, Cu^{2+} durante 2 h) que incrementan la expresión del gen *TtGspS4*. Por lo

tanto, parece existir actividad TryR, aunque nuestra búsqueda de algún gen homólogo a TryR en el genoma-macronuclear de *T. thermophila* ha sido fallida.

TryR, GR y TrxRs son enzimas relacionadas que se incluyen en la misma familia de disulfuro flavoproteínas oxidorreductasas diméricas. Como se puede apreciar en la Figura 116, entre los tres tipos de enzimas oxidorreductasas existen una considerable similitud entre aquellos dominios esenciales para el desarrollo de su capacidad reductasa (unión con FAD, sitio catalítico y unión con NADPH). En este alineamiento se incluyen 4 de las 5 TrxRs y la GR de *T. thermophila*, y como se observa en la Figura 116 todas ellas presentan los dos residuos de Cys del lugar activo, involucrados en la reacción de oxidoreducción. Igualmente, la Figura 117 muestra las conexiones filogenéticas entre los tres tipos de enzimas oxidoreductasas.

La especificidad de sustrato es determinada por 5 aminoácidos (2Cys, Thr, His y Glu), todos los cuales se presentan en las secuencias de 3 de las TtTrxR (TtTrxR1, TtTrxR2 y TtTrxR4) y en la TtGR. Como se ha mostrado en la TryR de *Leishmania donovani* (Cunningham and Fairlamb, 1995) el antimonio Sb (III) se une a los residuos Cys52, Cys57, Thr335 e His461, bloqueando la actividad enzimática de la TryR, de hecho es la principal droga utilizada contra la leishmaniasis. Como estos mismos residuos existen en 3 de las TtTrxR y en la TtGR, el Sb(III) podría posiblemente inhibir igualmente a estas enzimas.

Ante la ausencia de un gen homólogo a TryR en el genoma-macronuclear de *T. thermophila*, y la constancia experimental de la existencia de actividad tripanotión reductasa, podemos suponer que alguna de las TtTrxRs podría desempeñar esta función por su similitud estructural con la TryR. La TtTrxR2 podría ser una buena candidata, ya que el gen que codifica esta proteína es el que se expresa más en diferentes condiciones, pero fundamentalmente bajo Cu^{2+} y CDNB (Tabla 30), que corresponde con los tratamientos en que se obtiene mayores valores de actividad TryR (Figura 86).

Lugar de unión FAD		Lugar activo	
LmTryR	GAGSGGLEAGWNAAATYKKKVA	LmTryR	LGGTQVNVGQVPK----KLMVTGA
TbTryR	GAGSGGLEAGWNAATLYKKRVA	TbTryR	LGGTQVNVGQVPK----KLMVTGA
CfTryR	GAGSGGLEAGWNAASLHKKRVA	CfTryR	LGGTQVNVGQVPK----KLMVTGA
TtGR	GGSGGQASAKEAAS-FGARVG	TtGR	LGGTQVNVGQVPK----KMFHYAS
CrGR	GAGSGGVRAASRFAATLYGAKVA	CrGR	AGGTQVIRGQVPK----KLLVYGA
SpGR	GGSGGLASARRAAK-HGAKVA	SpGR	LGGTQVNYGQVPK----KIMWNIA
EcGR	GGSGGSIASINRAAM-YGQKCA	EcGR	LGGTQVNVGQVPK----KVMWHAA
HsGR	GGSGGLASARRAAE-LGARAA	HsGR	LGGTQVNVGQVPK----KVMWNTA
EcTrxR	GSGPAGYTAAYVYAAAR-ANLQPV	EcTrxR	KGGQLTTTTEVENWPGDPNDLTGP
HsTrxR	GGSGGLAAAKEAAQ-YGKKVM	HsTrxR	LGGTQVNVGQIPK----KLMHQAA
ScTrxR	GSGPAAHTAAIYLAR-AEIKPI	ScTrxR	AGGQLTTTTEIENFPGFDPDLTGS
TtTrxR1	GGSGGLAAAKEAAS-FGARVA	TtTrxR1	LGGTQVNVGQIPK----KLMHFAA
TtTrxR3	GGSGAGLSFALEAHK-LGMKTI	TtTrxR3	LGGTQVNVGQIPK----KLFHTAS
TtTrxR4	GGSGGLAFAFEAQK-LGMKAV	TtTrxR4	LGGTQVNVGQIPK----KLMHTAA
TtTrxR2	GGSGGLAASKEAAQ-FGVKVG	TtTrxR2	LGGTQVNVGQIPK----KLMHYAA

Lugar de unión NADPH

LmTryR	GGGYIAVEFAGIFNGYKPRGGYVDLCYRGDLILR
TbTryR	GGGFISVEFAGIFNAYKPPGGKVTLCYRNNLILR
CfTryR	GGGYISIEFAGIFNAYKARGGQVDLAYRGDMILR
TtGR	GASYVALECAGFLNGL---GYDVTVLVRS-KVLA
CrGR	GAGYIATEFAGIFRGTHAAQYAVHLMFRGDKVLR
SpGR	GAGYIAVELAGVFAAL---GTETHMFIRQSKFLR
EcGR	GAGYIAVELAGVINGL---GAKTHLFVRKHAPLR
HsGR	GAGYIAVEMAGILSAL---GSKTSLMIRHDKVLR
EcTrxR	GGGNTAVEEALYLSNI---ASEVHLIHRDGF-FR
HsTrxR	GASYVALECAGFLAGI---GLGVTVMVRS-ILLR
ScTrxR	GGGDSACEEAQFLTKY---GSKVFMLVRKDH-LR
TtTrxR1	GASYIALECAGFLAGF---GYDVTVMVRS-ILLR
TtTrxR3	GSGYIAFESAGFLSNL---GMNTTLMARG-QYLR
TtTrxR4	GGGYIALECSGFLSTL---GYDTTMMTRS-LYLR
TtTrxR2	GGSYIALECAGFLNGL---GYDVTVLYRS-VLLR

Figura 116. Alineamientos de regiones conservadas y relevantes para el funcionamiento de las enzimas Tripanotión reductasa (TryR), Glutación reductasa (GR) y Tiorredoxina reductasa (TrxR). Los aminoácidos idénticos están sombreados en gris. Los residuos de Cys que intervienen en el centro catalítico están sobreados en azul. Los organismos representados son los siguientes; Lm (*Leishmania major*), Tb (*Trypanosoma brucei*), Cf (*Crithidia fasciculata*), Tt (*Tetrahymena thermophila*), Cr (*Chlamydomonas reinhardtii*), Sp (*Schizosaccharomyces pombe*), Ec (*Escherichia coli*), Hs (*Homo sapiens*), Sc (*Saccharomyces cerevisiae*).

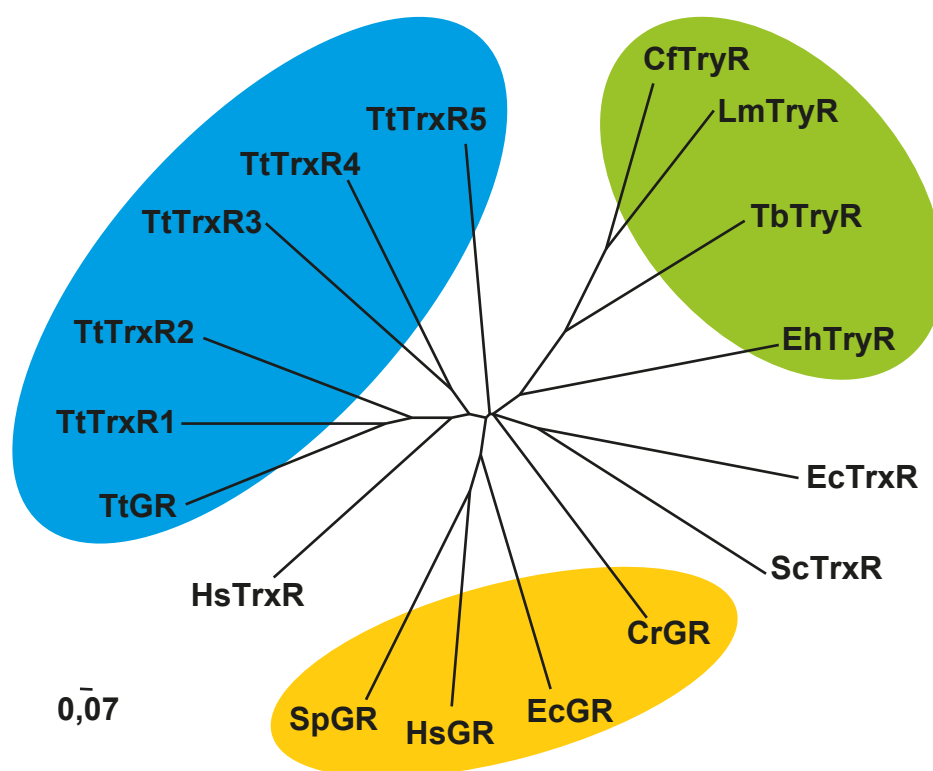


Figura 117. Filograma en donde se muestran las conexiones filogenéticas entre los tres tipos de enzimas oxidorreductasas (TryR, GR y TrxR) obtenidas de diferentes organismos. Cf (*Crithidia fasciculata*), Cr (*Chlamydomonas reinhardtii*), Ec (*Escherichia coli*), Eh (*Entamoeba histolytica*), Hs (*Homo sapiens*), Lm (*Leishmania major*), Sc (*Saccharomyces cerevisiae*), Sp (*Schizosaccharomyces pombe*), Tb (*Trypanosoma brucei*), Tt (*Tetrahymena thermophila*). La barra indica el número de sustituciones/sitio.

6.3 Modelo evolutivo de las TryS/GspS.

En el 2005, se propuso (Oza *et al.*, 2005) un modelo evolutivo para las TrySs a partir de las GspSs. Este modelo contempla la posibilidad de que una GspS ancestral con una estrecha especificidad de sustrato podría haber experimentado una duplicación génica, que tras divergencia podría haber originado dos genes independientes; *GspS* y *TryS* (con un 52 % de identidad), coexistiendo ambas en el mismo sistema vivo (como en *Crithidia*). Posteriormente, en algunas especies de *Trypanosoma* se perdería la copia *GspS*, manteniéndose con una única *TryS* de amplia especificidad (capaz de catalizar ambas reacciones en la biosíntesis del tripanotión). Estos mismos autores contemplan también una hipótesis alternativa consistente en que ambas enzimas (*GspS* y *TryS*) fueran adquiridas independientemente por un ancestro tripanosomátido. Lo que explicaría la localización de cada gen en diferentes cromosomas, como ocurre en *L. major*.

Más recientemente otros autores (Manta *et al.*, 2013), han propuesto un modelo similar más cercano a la hipótesis alternativa de Oza *et al.* (2005). Este modelo contempla la presencia

de una GspS en γ -protopobacterias ancestrales (de hecho la actual *E. coli* tiene una GspS) (Tabla 31), que mediante una endosimbiosis primaria podría haber transferido el gen al núcleo de un antepasado común eucariota (transferencia génica endosimbiótica), a partir del cual se transfirió a los euglenidos (ancestros de los kinetoplastidos). En kinetoplastidos bobónidos o en un antepasado de estos se produciría la duplicación del gen GspS, una posterior diversificación de una de las copias originando el gen TryS.

A la luz de los nuevos datos y la existencia de enzimas GspSs, con probable actividad tripanotión sintetasa, en protozoos ciliados, debemos de rehacer este modelo evolutivo al incorporar estos nuevos elementos. En la Figura 118 se muestra una propuesta de modelo evolutivo (inspirado en ambas propuestas previas). A partir de una GspS presente en el último ancestro común universal (LUCA), y que se mantendría en la línea procariota, se podría haber transferido a un antepasado común eucariota tras una endosimbiosis primaria por una γ -protopobacteria ancestral. Esta pasaría a los euglenoides (*Euglena gracilis* posee una GspS, Tabla 31), los cuales son los ancestros (tras perder los cloroplastos) de los kinetoplastidos. En un antepasado común de los kinetoplastidos (*Euglenozoa*) y alveolados (*Alveolata*) se produciría la duplicación del gen GspS, y una de las copias se transformaría en la TryS (recordemos que ambas enzimas son bastante similares), apareciendo así el T[SH]₂. Ambas podrían haber coexistido en este antepasado común eucariota, catalizando cada una de las dos etapas de la biosíntesis del T[SH]₂. Esta dualidad enzimática se mantiene en la mayoría de los tripanosomátidos, en donde coexisten ambas enzimas, aunque una de ellas (TryS) pueda (como en el caso de *C. fasciculata*) catalizar las dos etapas de la biosíntesis del T[SH]₂ (indicado como ambas actividades con un punto azul en la Figura 118). Por otro lado, *T. brucei* ha perdido la GspS, quedando sólo la TryS con ambas actividades catalíticas sintetasas. Algo similar pudo haber ocurrido en el caso de los ciliados, en donde existe una GspS que podría tener ambas capacidades catalíticas, tras perder la versión TryS. Al menos en *T. thermophila* esta enzima tendría la capacidad de biosintetizar T[SH]₂, ya que se ha demostrado su existencia. Igualmente, tras sucesivas duplicaciones parálogas, en este ciliado se han originado 4 isoformas génicas bastantes similares dos a dos; el par (*TtGspS1* y *TtGspS2*) y el par (*TtGspS3* y *TtGspS4*) localizado en el mismo brazo cromosómico (4L).

El modelo evolutivo mostrado en la Figura 118 representa una posibilidad entre otras aparentemente posibles.

El poder reductor del tripanotión es mayor que el del GSH, por su potencial redox y además porque la presencia de la pareja de tioles en una misma molécula favorece en mayor medida la reacción enzimática en comparación con el glutatión, donde deben coincidir espacialmente dos moléculas del tripéptido (Krauth-Siegel *et al.*, 2007). Por lo tanto, es indiscutible el

papel del tripanotión en las reacciones de oxidorreducción y por tanto en la defensa frente a estrés oxidativo.

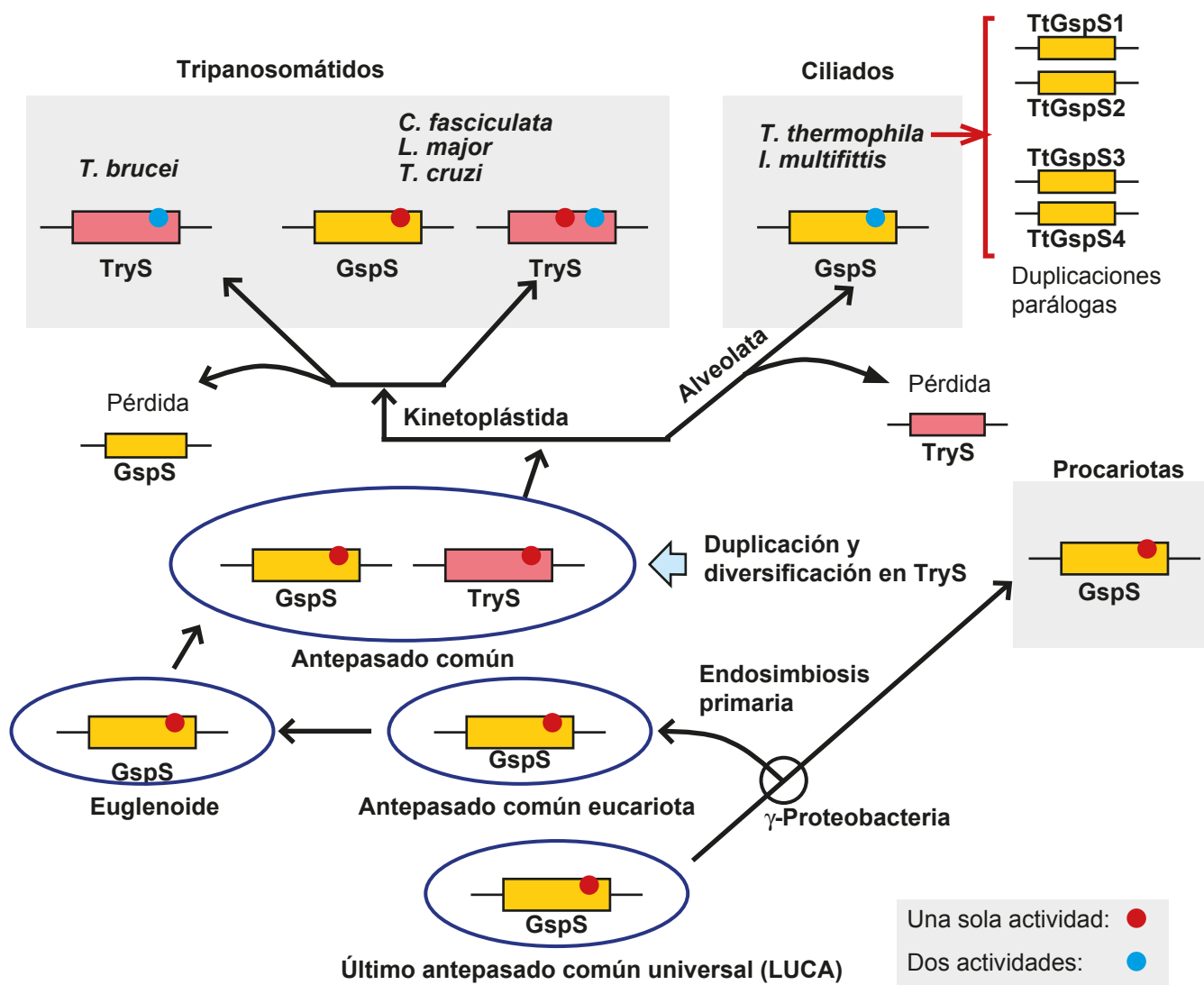


Figura 118. Esquema del modelo evolutivo propuesto para el tándem enzimático GspS/TryS. Para más explicación véase el texto.

El ciliado *T. thermophila* es uno de los pocos microorganismos (junto con *Entamoeba histolitica*) en donde podemos decir (con cierto nivel de certeza) que coexisten los tres sistemas antioxidantes (GSH/GR, T(SH)₂/TryR y Trx/TrxR), que presumiblemente podrían trabajar cooperativamente en la defensa contra el estrés oxidativo. Probablemente, los sistemas GSH/GR y Trx/TrxR son filogenéticamente anteriores al sistema tripanotión, que parece estar restringido a microorganismos eucariotas primitivos (protistas), y principalmente (pero no exclusivamente) en aquellos con una fase de parásito en su ciclo biológico. Todos los organismos aerobios

están expuestos a las diferentes especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas por su propio metabolismo, pero los protozoos parásitos no sólo han de eliminar su ROS endógeno sino que también el ROS originado por los mecanismos de defensa del hospedador frente al parásito (Muller *et al.*, 2003). Esto hace que el metabolismo redox de estos microorganismos eucariotas esté reforzado o utilice moléculas con un mayor poder reductor (como el tripanotión). Por esta razón, algunas de las enzimas redox (como la TryR) de estos parásitos se utilizan como dianas para el desarrollo de drogas, que se usan en la quimioterapia contra las enfermedades que estos microorganismos originan.

7. VISIÓN INTEGRADA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL Cd^{2+} y As^{5+} : POSIBLES ESCENARIOS O MODELOS DE LA RESPUESTA ESTRÉS EN *Tetrahymena thermophila*.

En esta última sección de la Discusión, intentaremos ofrecer una visión integrada de todos los resultados obtenidos, o parte de los mismos, que muestren coherencia para formar parte de lo que podríamos denominar “líneas de defensa” celulares probablemente presentes en el ciliado-modelo *T. thermophila*, como respuesta al estrés inducido por Cd^{2+} ó As^{5+} . En la Figura 119, se muestra un esquema de las enzimas más relevantes involucradas, directa o indirectamente, con el metabolismo del GSH, y de cuyos genes se han analizado, en este trabajo o en otros, los niveles de expresión frente al estrés provocado por estos dos cationes, e igualmente se resume los experimentos realizados en esta tesis en torno al GSH. Dos tipos de experimentos se han llevado a cabo:

- a) El efecto conjunto y por separado de inhibidores (biosíntesis del GSH) o bloqueadores (grupos tiólicos) y metal(oid)es (Cd^{2+} ó As^{5+}) entre otros agentes estresantes, sobre la mortalidad celular, la cantidad de grupos -SH disponibles y el glutatión total (GSH + GSSG),
- y b) Los niveles de expresión de los genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo del GSH (un total de 37 isoformas, indicadas en números rojos entre paréntesis en la Figura 119) bajo el estrés inducido por muy diversos agentes, junto con alguna actividad enzimática. Las enzimas cuyos genes se han analizado (en este u otros estudios en *T. thermophila*) se indican dentro de un elipsoide de color azul en la Figura 119.

Resumen de los experimentos en torno al metabolismo del GSH

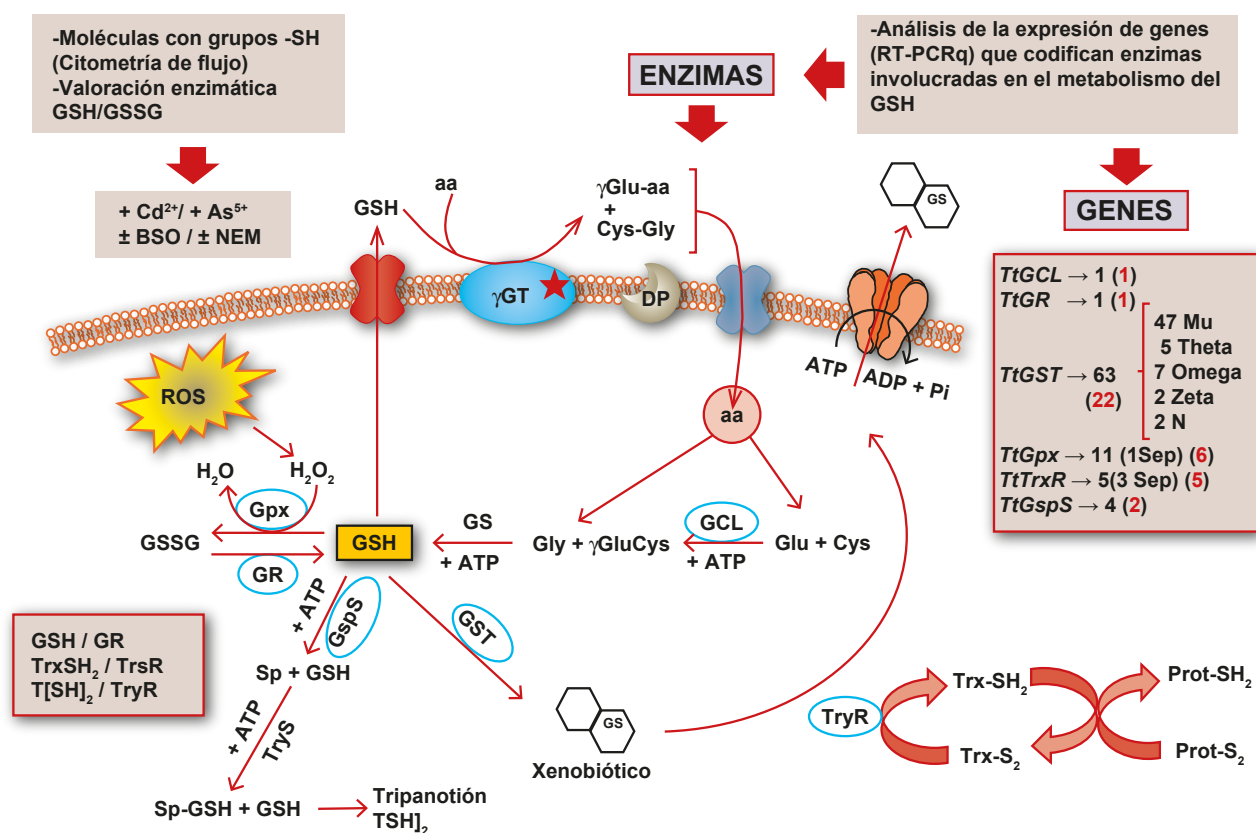


Figura 119. Esquema de los experimentos realizados en torno al metabolismo del GSH. Se indican (dentro de una elipse azul) las enzimas más importantes en las que se ha analizado los niveles de expresión de los genes correspondientes bajo el estrés originado por Cd^{2+} y As^{5+} . Para más explicación véase el texto.

Cuando existe un exceso de GSH puede transportarse a través de la membrana citoplasmática (mediante un transportador de GSH), y la γ GT (γ -glutamyl-transpeptidasa), localizada en la membrana, puede transferir el glutámico derivado del GSH a otro aminoácido, liberando el dipéptido Cys-Gly. Estos dipéptidos pueden, mediante una dipeptidasa (DP), liberarse y pasar a través de la membrana por mediación de un transportador de aminoácidos al citoplasma para su posterior utilización. La función de la γ GT en *T. thermophila*, podría ser realizada por una pseudo-fitoquelatinsintetasa (*Tt* ψ PCS) encontrada en este ciliado, que podría ser capaz de hidrolizar GSH (Amaro *et al.*, 2009), ya que no se ha detectado genes homólogos de esta enzima en el genoma-macronuclear de este ciliado. El gen que codifica la *Tt* ψ PCS es inducido ($\approx 7x$) en presencia de Cd^{2+} (tras 1 h de tratamiento) (Amaro *et al.*, 2009), esta respuesta podría estar coordinada con el incremento ($\approx 7x$) de los niveles de expresión del gen *TtGCL* (que origina GCL) en presencia de Cd^{2+} (tras 2 h de tratamiento).

T. thermophila presenta los tres sistemas antioxidantes; GSH/GR; TrxSH₂/TrxR y T[SH]₂/TryR, por lo que se han analizado los genes *TtGR* y *TtTrxRs*, junto con la actividad enzimática de una potencial TryR (al no encontrar genes homólogos de TryR en este ciliado).

7.1 Posible escenario de la respuesta estrés frente al As⁵⁺

Un posible escenario para el estrés originado por el metaloide arseniato (As⁵⁺) se representa en la Figura 120. Como ya se indicó en la Introducción, el arsénico es uno de los cationes inorgánicos más tóxicos, capaz de generar especies reactivas de oxígeno (principalmente peróxido de hidrógeno), peroxidación lipídica (PoL) en la membrana citoplasmática y mitocondrial, tiene carácter carcinógeno e induce varias vías de apoptosis. Este catión puede pasar al interior celular “parasitando” transportadores de fosfato (TP) (Figura 120). Recientemente (Yin *et al.*, 2011), se ha mostrado que *T. thermophila* puede reducir el catión As⁵⁺ (arseniato) a As³⁺ (arsenito), y en su genoma se ha localizado un posible gen que codifique una arseniato reductasa (AR), y además inactivarlo por bio-metilación originando monometil-arseniato (MMA) o dimetil-arseniato (DMA), por una arseniato/arsenito metiltransferasa (AMT). Luego, estos derivados metilados se pueden reducir por una MMA o DMA reductasa (MMAR / DMAR), respectivamente (Figura 120). Aunque el arsenito podría ser expulsado al exterior celular por una bomba tipo ABC, parece una contradicción que reduzca el As⁵⁺ a As³⁺, ya que en la mayoría de los seres vivos esta especie de arsénico (As³⁺) es más tóxica que el arseniato. Sin embargo, en *T. thermophila* (cepa silvestre) se ha comprobado (Rodríguez-Martín *et al.*, 2013) que el arseniato (As⁵⁺) es considerablemente más tóxico que el arsenito (As³⁺), ya que es ≈ 3x más resistente al arsenito que al arseniato.

El GSH podría constituir una primera o temprana “línea de defensa” frente al As⁵⁺ formando complejos con este catión (As-GS₂), e inactivándolo. Esta posibilidad podría estar corroborada por la sobre-expresión de la GCL (≈ 89x, tras 2 h de tratamiento con As⁵⁺). Igualmente, la utilización del GSH como fuente de poder reductor para la reducción del As⁵⁺ a As³⁺, implicaría un aumento de la actividad y cantidad de la GR, como se puede comprobar por el aumento de la expresión del gen *TtGR* (≈ 107x, tras 2 h de tratamiento con As⁵⁺) (Figura 120). El arseniato puede bloquear la producción de tioredoxina-reducida (TrxSH₂) por la enzima TrxR, necesaria para reducir otras proteínas (como las GPx que reducen el H₂O₂ originado por el arsénico) (Figura 120). Esto se puede deducir de los incrementos en la expresión de los genes *TrxR2* y *TrxR5* (≈ 100x y 65x, respectivamente, tras 2 h de tratamiento con arsénico), que codifican para dos TrxRs de alta masa molecular (H-TrxR).

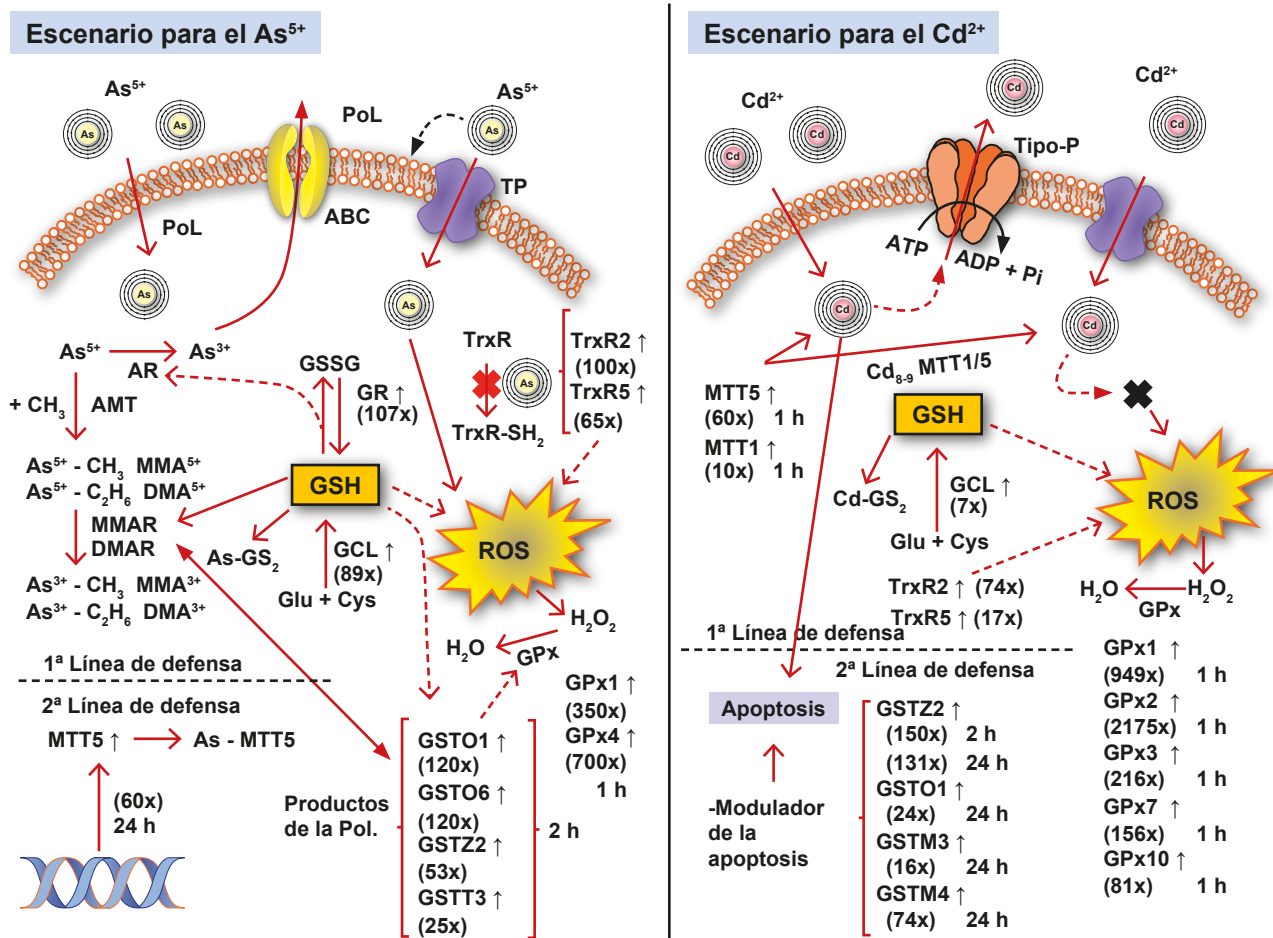


Figura 120. Esquema de los dos posibles escenarios o modelos que muestran los elementos implicados en la respuesta estrés frente al As⁵⁺ o al Cd²⁺. Entre paréntesis se indica el número de veces que se induce el gen correspondiente. Para una mayor explicación véase el texto. PoL: Peroxidación Lipídica.

El H₂O₂ originado por el As⁵⁺ puede descomponerse en H₂O por GPxs (Glutathionperoxidadas) o TPxs (tiorredoxinaperoxidadas). Las GPxs (EC. 1.11.1.9) son miembros de la triada enzimática SOD-CAT-GPx (superóxidodismutasa-catalasa-glutati6n peroxidasa) que forman parte de la defensa antioxidante en organismos procariotas y eucariotas aerobios. *T. thermophila* tiene en su genoma-macronuclear 11 isoformas génicas de posibles GPx (con un dominio conservado GPx), y se ha analizado la expresi6n de algunos de estos genes bajo estr6s por metales y otros agentes estresantes (Cubas *et al.*, 2011). Al menos, dos de ellos (*TtGPx1* y *TtGPx4*), se sobre-expresan significativamente frente al As⁵⁺ (tras 1 h de tratamiento), lo que podrí3a indicar la necesidad de incrementar la concentraci6n intracelular de estas enzimas para contrarrestar la formaci6n de per6xido de hidrógeno inducido por este metaloide.

Igualmente, algunos genes *GSTs* de este ciliado también se sobre-expresan (tras 2 h de tratamiento con As⁵⁺), tales como *TtGSTO1* (≈ 120x), *TtGSTO6* (≈ 120x), *TtGSTZ2* (≈ 53x) y *TtGSTT3* (≈ 25x) (Figura 120). Estas *GSTs*, podrí3an tener una funci6n GPx, como se ha detectado en algu-

nas GSTs (Board *et al.*, 2000), o estar involucradas en la detoxificación de productos de la peroxidación lipídica, transfiriendo GSH. Además, la MMA⁵⁺R requiere GSH para su función catalítica, y como se ha comprobado en los humanos (Aposhian *et al.*, 2004) esta función enzimática puede realizarse por una GST de la clase Omega. Precisamente, los dos genes GSTs que más se inducen en presencia de As⁵⁺ son ambos de la clase Omega (*TtGSTO1* y *TtGSTO6*) (Figura 120).

En una posible segunda (o más tardía) “línea de defensa” celular, se podría considerar a las metalotioneinas (MTs), ya que el gen que codifica la isoforma MTT5 (CdMT) de *T. thermophila* se sobre-expresa unas $\approx 60x$ (tras 24h de exposición al As⁵⁺) (Díaz *et al.*, 2007). Además, recientemente (Rodríguez-Martín *et al.*, 2013), se ha comprobado que cepas de *T. thermophila* (GFPMTT1 o GFPMTT5) con multicopia plasmídica que contiene el promotor MTT1 (otra isoforma de MT de este ciliado) unido a la región codificante del gen *MTT5* o *MTT1* y fusionado con la proteína reportera GFP (Green Fluorescent Protein), son considerablemente mucho más resistentes (menor mortalidad) tanto al As⁵⁺ como al As³⁺ que la cepa silvestre (sin el plásmido). Esto podría sugerir que la MT podría quelar (unir) tanto As⁵⁺ como el As³⁺, reduciendo su biodisponibilidad en el interior celular y, por lo tanto, haciéndolo menos tóxico.

7.2 Posible escenario de la respuesta estrés frente al Cd²⁺.

El Cd²⁺ puede penetrar en la célula tanto a través de la membrana citoplasmática como “parasitando” transportadores para cationes esenciales. Igualmente, podría ser expulsado al exterior celular mediante transportadores ATPasa de tipo-P (Figura 120). En *T. thermophila* existen 91 genes que codifican para presumibles P-ATPasas, y muy probablemente algunos sean para cationes inorgánicos. De hecho, son los más abundantes (485 genes), lo que representa un 51,6% del total de genes que codifican transportadores de membrana (Eisen *et al.*, 2006).

En una primera o temprana “línea de defensa”, tendríamos las metalotioneinas (MTs), principalmente la MTT5 y MTT1 de este ciliado, cuyos genes se sobre-expresan $\approx 60x$ y $10x$, respectivamente (tras 1 h de exposición al Cd²⁺) (Díaz *et al.*, 2007). Estas proteínas tienen una capacidad teórica de unir entre 8-9 cationes Cd²⁺ / molécula de proteína (Gutiérrez *et al.*, 2009), por lo que constituyen una verdadera “barrera” de protección celular, que minimiza la acción tóxica de estos cationes sobre enzimas fundamentales (Figura 120). El GSH, podría igualmente quelar parte de estos cationes o proporcionar poder reductor a otras enzimas involucradas en el sistema celular antioxidante. De hecho, el gen *TtGCL* involucrado en la codificación de GCL (enzima de la biosíntesis de glutatión) se sobre-expresa unas $7x$ (tras 2 h de exposición al metal). El Cd²⁺ puede indirectamente originar estrés oxidativo, con formación de peróxidos y supe-

róxidos (Gallego *et al.*, 2007; Rico *et al.*, 2009), por lo que las GPxs podrían tener una importante función eliminando el H_2O_2 . Existen 5 genes codificantes de diferentes isoformas de GPx que se sobre-expresan (a 1 h de tratamiento con Cd^{2+}) (Figura 120). Es el gen *TtGPx2* el que más se induce ($\approx 2.175x$), seguido por el gen *TtGpx1* ($\approx 949x$), que al igual que con el As^{5+} es uno de los que más se sobre-expresan. A continuación, y en menor cantidad, se inducen los genes; *TtGPx3* ($\approx 216x$), *TtGPx7* ($\approx 156x$) y *TtGPx10* ($\approx 81x$). Esto indica que las GPx (enzimas que catalizan la reducción de hidroperóxidos usando GSH como donador de electrones) tienen una importante función en la respuesta antioxidante inducida por el Cd^{2+} . Igualmente, los mismos genes *TrxRs* que se inducían con As^{5+} (*TtTrxR2* y *TtTrxR5*) también se inducen con el Cd^{2+} (tratamiento 2 h), aunque a niveles inferiores que con el As^{5+} ($\approx 74x$ y $\approx 17x$, respectivamente).

En una segunda o tardía “línea de defensa” celular, podrían intervenir GSTs (Figura 120). Puesto que el Cd^{2+} induce apoptosis en *T. thermophila* (Gutiérrez *et al.*, 2008), las GSTs pueden actuar como moduladores de la apoptosis. De hecho, 4 isoformas génicas de GSTs se sobre-expresan tras exposición al Cd^{2+} ; el gen *TtGSTZ2* (tanto a las 2 h como tras 24 h de exposición al metal), con unos niveles de inducción respecto del valor basal de 150x (2 h) y 131x (24 h). Esta isoforma también se expresa significativamente en presencia de As^{5+} (Figura 120), por lo que podría tener también una función similar a las GPxs. También, el gen *TtGSTO1* se sobre-expresa bajo la acción de ambos tipos de cationes (tempranamente en el caso del As^{5+} o tardíamente bajo el estrés por Cd^{2+}). Otras dos GSTs aparecen en el escenario del estrés por Cd^{2+} ; la GSTM3 y la GSTM4, cuyos genes se inducen $\approx 16x$ y $\approx 74x$, respectivamente.

Aunque el ciliado *T. thermophila* presenta los tres tipos de sistemas antioxidantes, parece que los más implicados en la respuesta frente a As^{5+} o Cd^{2+} son el GSH/GR y el $TrxSH_2/TrxR$. Sin embargo, no parece que el sistema $T[SH]_2/TrxR$ tenga una función importante en la defensa frente al As^{5+} o el Cd^{2+} , aunque se requiere una mayor experimentación al respecto.

Por supuesto, en estos dos posibles escenarios pueden faltar otros elementos, que aún no han sido analizados, y que en un futuro podrían enriquecer nuestro conocimiento sobre la respuesta estrés de este ciliado-modelo frente a estos cationes tóxicos.

Introducción

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Resumen de resultados

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

Resumen de resultados

A) Sobre la respuesta estrés frente a metal(oid)es.

A1- El Cd^{2+}

- 1) El ciliado-modelo *Tetrahymena thermophila*, responde al estrés originado por el Cd^{2+} mediante dos principales moléculas con grupos tiólicos; las metalotioneinas (principalmente la MTT5 y MTT1) (Díaz *et al.*, 2007) que quelan el metal disminuyendo así la biodisponibilidad intracelular del mismo y evitando la interacción con enzimas y otras macromoléculas fundamentales, y el GSH (glutatión) como parte del sistema celular antioxidante (GSH/GR), el cual constituye la fuente de poder reductor para contrarrestar el estrés oxidativo inducido por el Cd^{2+} , en la que intervienen enzimas como las GPxs (se sobre-expresan al menos 5 isogenes) y las TrxRs (se sobre-expresan al menos 2 isogenes).
- 2) El Cd^{2+} también induce apoptosis en *T. thermophila* (Gutiérrez *et al.*, 2008), lo que podría requerir la presencia de moléculas moduladoras de este proceso, como las GSTs (se sobre-expresan al menos 4 isogenes).

A2- El As^{5+}

- 1) En *T. thermophila* el principal componente de la primera línea de defensa frente al estrés originado por el As^{5+} es el GSH, actuando como fuente de poder reductor para enzimas involucradas en desactivar el estrés oxidativo inducido por este metaloide, como son las TrxRs y las GPxs (se sobre-expresan al menos 2 isogenes de cada tipo enzimático). Igualmente, la reducción del As^{5+} a As^{3+} (demostrada en este ciliado por Yin *et al.*, 2011) requiere GSH para la correspondiente enzima (arseniato reductasa). De la misma forma, las GSTs (que, al menos, se sobre-expresan 4 tipos) gastan GSH que pueden trans-

ferir a productos derivados de la peroxidación lipídica producidos por el As^{5+} .

- 2) En una segunda o tardía "línea de defensa", y tras una exposición prolongada al As^{5+} , las metalotioneinas pueden tener una función detoxificante del As^{5+} capturando dicho metaloide.

A3- Otros cationes inorgánicos

- 1) El Pb^{2+} , al igual que el Cd^{2+} o el As^{5+} , también induce los genes del sistema celular antioxidante GSH/GR, ya que son los genes *TtGCL* (síntesis de glutatión) y *TtGR* (reducción del glutatión) los que se sobre-expresan significativamente, tanto tras exposición corta como prolongada. También, induce la expresión de los genes; *TtGSTO1/6* y *TtGSTT1/3*, que, igualmente, están entre los que se expresan con Cd^{2+} y As^{5+} .
- 2) El Cu^{2+} y el Zn^{2+} , metales esenciales, son los que, en general, inducen la expresión de un menor número de los genes que se han seleccionado, y con menores valores de inducción. Curiosamente, son los genes *TtGspS2* y *TtGspS4* (que prácticamente no se expresan con los anteriores metal(oid)es), los que más se expresan con estos metales. Lo que se corresponde con los niveles intracelulares más elevados de tripanotión tras tratamiento con estos metales. Igualmente, algunos genes *TtTrxRs* (*TtTrxR2* y *R5*) se sobre-expresan algo frente al estrés originado por estos metales, aunque no con los niveles que lo hacen con el Cd^{2+} o el As^{5+} (más tóxicos). Por lo que, al parecer, estos metales al ser esenciales y menos tóxicos, no requieren una defensa tan importante como la que desarrolla la célula para el Cd^{2+} o el As^{5+} .

B) Sobre la respuesta estrés frente a moléculas oxidantes y electrófilas

B1- El CDNB

- 1) Como cabría esperar el CDNB (sustrato de GSTs e inductor universal de la expresión de sus genes) es la molécula que induce un mayor número de clases e isoformas de genes *GSTs* (todos los analizados se sobre-expresan en presencia del CDNB), a excepción de la isoforma *TtGSTM40* que tampoco se expresa con ninguna de las condiciones estrés ensayadas.
- 2) Igualmente, los genes del sistema antioxidante GSH/GR se sobre-expresan en presencia del CDNB, suministrando así GSH para las GSTs. Los otros dos sistemas antioxidantes ($\text{TrxSH}_2/\text{TrxR}$ y $\text{T(SH)}_2/\text{TryR}$) presentes en *T. thermophila* también responden al CDNB,

principalmente con la sobre-expresión del gen *TtTrxR2* (entre otros) y exclusivamente con la del gen *TtGspS4* (más de 200 veces el nivel basal). La cantidad de $T(SH)_2$ en el citoplasma en presencia de CDNB es similar a la de los controles, por lo tanto, parece que el CDNB demanda mayor cantidad de $T(SH)_2$, por lo que se sobre-expresa el gen *TtGspS4* y se gasta más $T(SH)_2$ en la defensa frente al estrés oxidativo originado por el CDNB.

B2- La MD y el PQ

- 1) La MD no parece ser un agente que induzca estrés oxidativo de manera tan potente o eficaz como el CDNB (tras el mismo periodo de tratamiento), a la vista del número de genes cuya expresión induce. De todos ellos, solo el *TtGCL* (síntesis de GSH) se sobre-expresa de manera llamativa (más de 100 veces) indicando el requerimiento de GSH, y que se corresponde con la disminución de glutatión total y el aumento de la mortalidad celular ocasionado por la MD. El resto (4 *TtTrxRs* y 4 *TtGSTs*) se sobre-expresan a niveles no superiores a 10 veces el nivel basal.
- 2) El PQ (tras exposición prolongada), induce significativamente la sobre-expresión de 5 genes *GSTs*, el gen *TtGCL*, el *TtGspS4* y sólo dos *TtTrxRs*. El gen *TtGCL* presenta el siguiente ranking de capacidad de inducción para los tres agentes oxidantes utilizados; MD >>CDNB >PQ, lo que indica la necesidad del GSH para contrarrestar el estrés oxidativo producido por estos compuestos. Otro gen que es inducible por los tres agentes oxidantes es el *TtGSTO1*, que presenta un ranking CDNB >>PQ >MD, y el resto de los genes son inducibles por sólo uno o dos de estos agentes oxidantes. El PQ suele estar el último o penúltimo de este ranking de valores de capacidad de inducción.

C) Sobre la respuesta estrés frente a otros agentes.

C1- El pH

- 1) El pH ácido (pH 5) induce, casi exclusivamente, la sobre-expresión (más de 100 veces) del gen *TtGCL* (síntesis de GSH), ya que los dos genes *TtGST* (*M3* y *Z2*) lo hacen a niveles muy inferiores (menos de 5 veces), y el resto de los genes analizados no se expresan bajo un estrés ácido prolongado (24h). La función del GSH bajo un estrés ácido es muy poco conocida, sin embargo se sabe que en bacterias el GSH protege a la célula contra un estrés ácido (Ricciolo *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007), siendo, por lo tanto, la primera vez que se muestra en un microorganismo eucariota la inducción de la expresión del

gen *GCL* por un pH ácido. Sin embargo, los niveles intracelulares de glutatión total en condiciones ácidas, tras inhibir (con BSO) la enzima GCL, permanecen iguales que los del control a pH ácido (sin BSO), lo que podría interpretarse como que los niveles de inhibición por BSO son inferiores a los de producción de nueva GCL, manteniéndose así los niveles de GSH a pH ácido, que son muy similares a los del control a pH neutro. Probablemente, la presencia de BSO también sobre-expresa el gen *GCL*.

2) El pH básico (pH 9) no induce sobre-expresión relevante de ninguno de los genes analizados.

C2- Inanición

Una inanición por 24 h sólo induce significativamente la sobre-expresión (≈ 32 veces) del gen *TtTrxR5* (sin el dominio TrxR), de todos los genes analizados. Esta región equivaldría a la EST (DY678605.1) que ha sido aislada de genotecas de expresión obtenidas tras inanición (1-6 h) (Turkewitz, datos no publicados), y podría tener alguna función importante durante la inanición (que aún desconocemos).

D) Sobre el gen *TtGCL*.

- 1) *T. thermophila* contiene en su genoma macronuclear un gen (que hemos denominado *TtGCL*) codificante de la enzima GCL (glutamato cisteína ligasa), el cual se encuentra en monocopia al igual que en otros microorganismos eucariotas, tales como; *Trypanosoma brucei* o *Schizosaccharomyces pombe*.
- 2) La proteína TtGCL inferida es única entre los microorganismos eucariotas, ya que es una de las GCLs más pequeñas conocidas (405 aa), incluyendo las de otros protozoos (*Paramecium tetraurelia* o *Ichthyophthirius multifiliis*, que están dentro del rango del tamaño promedio de las GCLs), siendo, por el contrario, más similar al tamaño de aquellas de cloroplastos, ciertas bacterias patógenas y cianobacterias. Sin embargo, su identidad hace que se clasifique en el grupo de los eucariotas (excluyendo a los vegetales), junto con la de los mamíferos, nematodos, insectos y protozoos parásitos.
- 3) El análisis filogenético de las GCLs ha revelado que la TtGCL se incluye dentro del grupo de protistas con un origen común con el resto de los eucariotas (exceptuando plantas y algas). Las GCLs de protistas (incluyendo la TtGCL) parece tener como ancestro la GCL de *Trypanosoma* (kinetoplástico), que a su vez pudo estar relacionada con las GCLs de cianobacterias. Las tres GCLs de ciliados analizadas están conectadas con la PbGCL (*Plasmodium berghei*) (apicomplexa), lo que coincide con la filogenia basada en otras proteínas, tales como α y β -tubulinas.

- 4) La historia evolutiva de las GCLs, tras aplicar la teoría de la endosimbiosis seriada o simbiogénesis, podría haber seguido el siguiente camino; Cianobacterias → Cloroplastos (endosimbiosis secundaria en un primer eucariota aerobio) → Rhodofitas → (endosimbiosis terciaria en un flagelado heterótrofo – Euglénido) → Dinoflagelado autótrofo (Cryptomonádido) → (otra endosimbiosis terciaria en un flagelado heterótrofo) → Ciliados (Ciliophora). El grupo Alveolata (que incluye a los ciliados) tiene un ancestro común con Excavata, que engloba a Euglenozoa (en donde se encuentra *Trypanosoma*). En la lista de genes de origen plastídico que pudieron transferirse del genoma endosimbionte (plástido) al núcleo del hospedador (eucariota heterótrofo), están dos relacionados con el metabolismo del glutatión; la GSH reductasa y la GSH peroxidasa, a la cual podríamos también incorporar la GCL, filogenéticamente anterior a las dos citadas. Las características de la GCL de *T. thermophila* y otros protozoos ciliados apoyan así este posible modelo evolutivo.
- 5) La inducción transcripcional del gen *TtGCL* es superior tras exposiciones cortas (2 h) frente a tratamientos prolongados (24 h) para el mismo metal(oide). Lo que coincide con la idea de que la célula responde rápidamente (1ª barrera de defensa) frente a la toxicidad oxidativa originada por la presencia del metal(oide). Esto se hace muy patente en el caso del ión arseniato (As^{5+}), junto con otros compuestos que originan estrés oxidativo (como la MD y el CDNb). Todo lo cual indica que el GSH es un elemento esencial en la defensa frente al estrés oxidativo en *T. thermophila*, al igual que en otros seres vivos.

E) Sobre la familia de GSTs de *T. thermophila*.

E1- Características estructurales e implicaciones filogenéticas

- 1) En el genoma macronuclear de *T. thermophila* existen 63 genes que codifican posibles GSTs, por lo que este ciliado es el ser vivo, hasta ahora conocido, con el mayor número de genes *GSTs*. El análisis estructural de las proteínas que se infieren de cada uno de ellos ha revelado que 47 ($\approx 74\%$) de ellas se identifican como GSTs de la clase Mu, hasta ahora una clase de GSTs considerada exclusiva de mamíferos. Además, tanto *T. thermophila* como *P. tetraurelia* tienen dos isoformas no clasificables dentro de las clases conocidas, por lo que se podrían considerar como específicas de especie.
- 2) A diferencia de otras GSTs (como las humanas), la mayoría de genes *GSTs* de *T. thermophila* no presenta intrones. Esta ausencia impide que se origine el proceso de “splicing alternativo” que conlleva variabilidad entre las GSTs, por lo que podría ser una explicación del elevado número de isogenes presentes en este ciliado para responder a

los diferentes sustratos. Por el contrario, todos los genes GST de *P. tetraurelia* tienen intrones.

- 3) Al igual que en otros organismos, los genes GSTs de *T. thermophila* tienden a presentarse agrupados en “tándem” en el mismo cromosoma o región cromosómica, y que junto con la existencia de un mayor grado de homología entre los más próximos, nos indica el posible origen de los mismos por duplicación génica y posterior diversificación, originando parálogos.
- 4) Las GSTs de *T. thermophila* (y probablemente las de *P. tetraurelia*) son, de momento, las únicas GSTs de protozoos estudiadas que se identifican con las de mamíferos, tanto a nivel de homología de secuencias como de estructura 3D, a diferencia de lo que encontramos en otros protozoos, tales como; *Blepharisma japonicum* y *Plasmodium falciparum*.
- 5) La presencia de GSTs de la clase Mu en protozoos ciliados, tales como *T. thermophila* y *P. tetraurelia*, altera ciertos aspectos del modelo estándar sobre la historia evolutiva de las GSTs citosólicas:
 - a) Las GSTs de clase Mu ya no se pueden considerar exclusivas de mamíferos. Como los protozoos ciliados datan del Proterozoico (Paleo-/Meso-proterozoico) (hace $\approx 10^9$ años), son más antiguos que los hongos y, por supuesto, los vertebrados, por lo que la clase Mu de GSTs parece ser más antigua de lo que se suponía.
 - Y b)- Igualmente, la presencia de Tyr (Y) en la región catalítica (sitio-G) no parece ser una novedad de las GSTs de clase Mu de mamíferos, puesto que ya existían en GSTs de ciliados, coexistiendo con la Ser (GSTs Theta y Zeta) y la Cys (GST Omega).
- 6) Tres GSTs de *T. thermophila* clasificadas como Mu (TtGSTM1, M8 y M45) presentan características únicas entre las GSTs conocidas:
 - a) La TtGSTM1 es la primera GST descrita con un dominio “RING-finger”, y una posible actividad similar a enzimas E3 (ubiquitin-ligasa), además de la actividad glutatión transferasa.
 - b) Igualmente, la TtGSTM8 es la primera GST descrita con un dominio GCC y podría estar involucrada en la organización y/o función del sistema de Golgi.
 - Y c) Las tres TtGST (M1, M8 y M45) presentan dominios transmembrana y además presentan homología con las típicas GSTs citosólicas (o solubles, no asociadas a membrana) de clase Mu. Por lo tanto, constituye una interesante excepción encontrar tres GSTs citosólicas que sin embargo están asociadas a membrana.

E2- Expresión de los genes *TtGSTs*

- 1) La comparación entre patrones de expresión de los genes *TtGSTs* analizados refleja cierto nivel de expresión diferencial entre algunos de ellos. Como, por ejemplo; *TtGSTM3* y *TtGSTZ2* responden frente al estrés por pH ácido y/o básico del medio a diferencia del resto analizado.
- 2) Con respecto a la inducción por metal(oid)es, existe una prelación de valores de inducción entre los genes *TtGSTs* analizados, estando en los primeros lugares del ranking el gen *TtGSTZ2*, junto con los genes *TtGSTO1* y *TtGSTO6*, en los inducidos por metal(oid)es no esenciales. Por lo tanto, estos tres genes serían los principales involucrados en contrarrestar la toxicidad de estos cationes. Los metal(oid)es que mayor número de genes *TtGSTs* inducen son el Cd^{2+} y el As^{5+} . Por otro lado, los metales esenciales (Cu^{2+} y Zn^{2+}) son los que inducen un menor número de estos genes.
- 3) Muchos de los genes *TtGSTs* que responden a metal(oid)es, responden igualmente a un estrés oxidativo originado por compuestos orgánicos.
- 4) Los genes *TtGSTs* específicos de especie (*TtGSTN1* y *N2*), junto con el *TtGSTM9* y *TtGSTZ1* son los que muestran una mayor especificidad o selectividad en su respuesta al estrés (sólo se inducen frente a 3 ó 4 agentes diferentes). Mientras que los genes *TtGSTM3*, *TtGSTO1* y *TtGSTZ2* son los que muestran una respuesta estrés más amplia o a un mayor número de agentes o condiciones de estrés.
- 5) La totalidad de los genes *TtGSTs* (a excepción del *TtGSTM40*) responden al sustrato e inductor de GSTs (CDNB). Se sabe que la afinidad por el sustrato CDBN varía para cada clase de GST, y en las que se consideran las más primitivas (o más cercanas a la proteína ancestral, como se supone que son la clase Omega o Theta) tienen muy poca o ninguna actividad con el CDBN. Sin embargo, los genes *TtGSTs* analizados de ambas clases (*TtGSTO1 /O6* y *TtGSTT1 /T3*) son considerablemente inducibles por CDBN, independientemente de que pueda o no ser utilizado como sustrato por estas enzimas. Por lo tanto, parece ser que el carácter "sustrato de GST" e "inductor de la expresión de genes GSTs" podrían ser independientes.
- 6) *T. thermophila*, junto con *P. tetraurelia*, son dos modelos de ciliados ejemplos paradigmáticos de redundancia génica. Uno de los procesos selectivos que conlleva redundancia génica es la adaptación a cambios ambientales, dando origen a ecoparálogos de divergencia intermedia o baja (elevado % de identidad). La familia de genes *TtGSTs* parece estar, al menos en parte, constituida por ecoparálogos.

F) Sobre la familia de TrxRs y la GR de *T. thermophila*.

F1- Características estructurales e implicaciones filogenéticas

- 1) *T. thermophila*, junto con protozoos parásitos del filo *Apicomplexa*, presenta TrxRs del tipo H (elevada masa molecular) con un motivo catalítico típico de esta clase. Hasta ahora, son los únicos del filo *Alveolata* (probablemente existan otros) en que coexisten TrxRs y GR. El resto de los protozoos en donde se ha estudiado, o no tienen TrxR (sustituyéndola por GR y/o TryR) o la tienen del tipo L-TrxR (baja masa molecular) como única piridina-nucleótido-disulfuro oxidorreductasa.
- 2) Tres de las cinco TtTrxRs (TtTrxR1, R3 y R4) son selenoproteínas que se podrían incluir en las de tipo-III (como las de mamíferos), mientras que las dos restantes (TtTrxR2 y R5) se pueden incluir en las de tipo-II (como las de insectos).
- 3) El análisis filogenético revela la posibilidad de un origen común de la TtGR con el de las TrxRs, que a su vez tendrían un origen común con una proteína ancestral que podría ser similar a GR. Pero la presencia de la TtGR dentro de las TrxRs, nos hace pensar que al menos en algunos protistas (como *Tetrahymena*) la GR pudo surgir de una TrxR que perdió el típico C-terminal catalítico propio de estas enzimas.
- 4) El bajo número de selenoproteínas presentes en el ciliado *T. thermophila* (microorganismo eucariota predominantemente presente en medios acuáticos), no corrobora la hipótesis propuesta por Lobanov *et al.* (2007) en la que organismos acuáticos presentan un mayor número de selenoproteínas.

F2- Expresión de los genes *TtTrxRs* y *TtGR*

- 1) Existe un comportamiento temporal diferente entre los cinco genes *TtTrxRs*, para un mismo agente inductor de la expresión. Tres de ellos presentan los mayores niveles de expresión tras exposiciones cortas, mientras que los dos restantes lo hacen tras exposiciones prolongadas. Por el contrario, el gen *TtGR* responde en mayor o menor grado dependiendo del tipo de agente inductor y no del tiempo de exposición.
- 2) Los genes *TtTrxR2*, *TtTrxR5* y *TtGR* son los que mejor responden frente a los metal(oid)es más tóxicos y que generan estrés oxidativo (As^{5+} y Cd^{2+}). Los tres no son selenoproteínas, por lo que se podría suponer que los residuos de Cys con grupo -SH en lugar de -SeH tendrían una mayor afinidad por los metal(oid)es, inhibiendo así el sitio catalítico de las mismas, y por lo tanto induciendo un mayor nivel de expresión de estos genes con la finalidad de incrementar la concentración intracelular de enzimas viables.

G) Sobre el sistema T[SH]₂ / TryR y genes similares a TryS o GspS en *T.thermophila*.

G1- Características de las GspS de *T. thermophila*

- 1) El genoma-macronuclear de *T. thermophila* presenta 4 genes que tienen cierta similitud con GspS de otros microorganismos (principalmente con GspS de bacterias). Estas 4 versiones o isogenes parece una excepción ligada al carácter poli-isogénico del genoma de ciliados, ya que en el resto de microorganismo estos genes se encuentran en monocopia.
- 2) Ninguna de las 4 TtGspS tienen el dominio amidasa, por lo que sus semejanzas con otras GspS o TryS reside exclusivamente en el dominio sintetasa. La sola presencia del dominio sintetasa en las 4 TtGspS es una característica exclusiva de las GspS de *T. thermophila*, ya que en el resto de organismos con GspS o TryS presentan siempre ambos dominios.

G2- Expresión de los genes GspS

Del análisis comparativo de los dos genes *TtGspSs* cuya expresión se ha analizado por RT-PCR cuantitativa y comparado con genotecas de expresión o *microarrays*, inferimos que; el gen *TtGspS2* se expresa principalmente en condiciones de ausencia de estrés a excepción de una exposición prolongada al Zn²⁺, mientras que el gen *TtGspS4* se expresa principalmente en condiciones de estrés celular.

G3- Presencia y biosíntesis de T[SH]₂ en *T. thermophila*

- 1) Independientemente de la fase de crecimiento, los niveles de GSH, T[SH]₂ y Gsp mantienen el siguiente ranking de valores intracelulares; GSH > T[SH]₂ > Gsp. A lo largo de la curva de crecimiento, el comportamiento de los niveles de T[SH]₂ intracelular en *T. thermophila* son similares a aquel que se detecta en *Trypanosoma cruci*, es decir; los valores más altos se detectan al inicio de la fase exponencial.
- 2) Al relacionar los niveles intracelulares de T[SH]₂, tras exposición a diferentes agentes tóxicos, con los niveles de expresión del gen *TtGspS4* bajo el efecto de esos mismos agentes tóxicos, inferimos que; El CDNB demanda mayor cantidad de T[SH]₂, se expresa más el gen *TtGspS4* y se gasta más T[SH]₂, mientras que el Cu²⁺ demanda menos T[SH]₂ expresándose menos el mismo gen, gastando menos y acumulando más T[SH]₂.
- 3) La existencia de T[SH]₂ en *T. thermophila* se ha comprobado tanto por HPLC como por

espectrometría de masas. Sin embargo, los posibles genes involucrados en su síntesis se asemejan más a GspS. Por lo que proponemos que, al igual que en algunos tripanosomátidos sólo existe una enzima (nominada como TryS) que puede catalizar ambos pasos en la biosíntesis de T[SH]₂, en *T. thermophila* podría igualmente existir una enzima (más similar a GspS) que pudiera catalizar ambos pasos de la biosíntesis de T[SH]₂.

- 4) En *T. thermophila* existe una actividad similar a la de TryR ($T(S)_2 \rightarrow T[SH]_2$), lo cual ratifica la presencia de T(SH)₂ en este ciliado. Aunque esta actividad es tres veces menor que la GR, ambas incrementan tras la presencia de metales (Cu²⁺ y Zn²⁺). Sin embargo, no hemos encontrado un gen homólogo a TryR en el genoma-macronuclear de este ciliado. Por su similitud estructural con TryRs, alguna de las tres TtTrxR (R1, R2 ó R4) podría desempeñar esta función, principalmente la TtTrxR2. Ya que el gen correspondiente se expresa más tras tratamiento con Cu²⁺ o CDNB, que se corresponde con los mismos tratamientos en que se obtienen mayores valores de actividad TryR.

G4- Presencia de los tres sistemas antioxidantes en *T. thermophila*

T. thermophila presenta los tres sistemas antioxidantes (GSH/GR, TrxSH₂/TrxR y T[SH]₂/TryR), como ocurre con *Entamoeba histolytica* (Tamayo et al., 2005), algo poco usual entre los microorganismos eucariotas. Atendiendo a los resultados globales obtenidos en este ciliado, y en las condiciones estrés ensayadas, los niveles de actividad de estos tres sistemas siguen el ranking GSH/GR > TrxSH₂/TrxR > T[SH]₂/TryR. Por lo que en *T. thermophila* el sistema basado en T[SH]₂ podría tener solo un papel secundario en el mantenimiento de la homeostasis celular redox, aunque también podrían los tres sistemas actuar coordinadamente en la defensa antioxidante de la célula.

G5- Nuevo modelo evolutivo de las TrySs / GspSs

Como consecuencia de los resultados obtenidos sobre la presencia del sistema T[SH]₂/TryR en *T. thermophila*, el modelo de la historia evolutiva de las TrySs / GspSs propuesto por varios autores (Manta et al. 2013; Oza et al. 2005) ha de modificarse. Los principales elementos diferenciales que constituyen el nuevo modelo contempla que a partir de un ancestro común para los kinetoplastidos y alveolados se originó la duplicación génica y diversificación que originó el gen TryS a partir del GspS ambos con una función catalítica diferente, y dando pie a la formación del T[SH]₂. Posteriormente, tanto en algunos tripanosomátidos como en ciliados, se pudo originar la pérdida de la copia GspS (como en *T. brucei*) o la copia del gen TryS (como en *T. thermophila*). Pudiéndose realizar ambas reacciones de la síntesis del T[SH]₂ por una sola de estas enzimas (TryS o GspS).

Introducción

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Resumen de resultados

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

Introducción

Objetivos

Materiales y
Métodos

Resultados

Discusión

Resumen de
resultados

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

Conclusiones

Como consecuencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos establecer las siguientes conclusiones generales:

- 1) Actualmente, *Tetrahymena thermophila* es el único protista de vida libre en el que coexisten tres sistemas antioxidantes diferentes; GSH/GR, TrxSH₂/TrxR y T[SH]₂/TryR. Según los resultados globales obtenidos y en las condiciones estrés ensayadas, los niveles de actividad de estos tres sistemas siguen el orden GSH/GR > TrxSH₂/TrxR > T[SH]₂/TryR. Por lo que en este ciliado, el sistema basado en T[SH]₂ podría tener solo un papel secundario en el mantenimiento del equilibrio redox, aunque también los tres sistemas podrían actuar coordinadamente en la defensa antioxidante de la célula.
- 2) Los resultados con un inhibidor de la biosíntesis de glutatión (BSO) o un bloqueante de grupos tiólicos (NEM), han puesto de manifiesto la relevancia del glutatión y de otras moléculas con grupos (-SH) en la defensa celular frente a metales/metaloideos o agentes oxidantes.
- 3) La GCL de *T. thermophila* es única entre los microorganismos eucariotas estudiados, ya que es una de las GCLs más pequeñas conocidas (405 aa). Por su localización filogenética la GCL de este ciliado corrobora la idea de su posible origen plastídico, junto con otras enzimas del metabolismo del GSH (como GSH reductasa y GSH peroxidasa).
- 4) *Tetrahymena thermophila* es actualmente el ser vivo con mayor número (63) de isoformas génicas de GSTs. El 74% de ellas se clasifican dentro de la clase Mu, hasta ahora una clase de GSTs considerada exclusiva de mamíferos. Por consiguiente, la presencia de GSTs de la clase Mu en protozoos ciliados, tales como *T. thermophila* y *P. tetraurelia*, altera ciertos aspectos del modelo-estándar sobre la historia evolutiva de las GSTs citosólicas.

- 5) El análisis comparativo de la expresión de algunos de los isogenes de GSTs, nos muestra cierto nivel de expresión diferencial entre algunos de ellos, bajo diferentes condiciones de estrés. Por lo que, la familia de genes *TtGSTs* parece estar, al menos en parte, constituida por ecoparálogos.
- 6) Los experimentos con CDNB (sustrato inductor de GSTs), muestran la posibilidad de que el carácter "sustrato de GST" e "inductor de genes GSTs" podrían ser características independientes.
- 7) *T. thermophila*, junto con protozoos parásitos del filo *Aplicomplexa*, actualmente son los únicos del superfilo *Alveolata* en que coexisten TrxRs y GR. E igualmente, es el único protista, no fotosintético ni parásito, que presenta TrxRs del tipo-H (de elevada masa molecular), las cuales son características de animales.
- 8) El análisis filogenético revela la posibilidad de un origen común de la TtGR con el de las TrxRs, que a su vez tendrían un origen común con una proteína ancestral que podría ser similar a GR. Pero la presencia de la TtGR dentro de las TrxRs, nos hace pensar que al menos en algunos protistas (como *Tetrahymena*) la GR pudo surgir de una TrxR que perdió el típico dominio C-terminal catalítico propio de estas enzimas.
- 9) La sola presencia del dominio sintetasa en las cuatro GspS de *T. thermophila* es una característica exclusiva de este microorganismo, ya que en el resto de los organismos estudiados con GspS o TryS siempre presentan ambos dominios (amidasa + sintetasa).
- 10) Proponemos que, al igual que en algunos tripanosomátidos solo existe una enzima (identificada como TryS) capaz de catalizar ambos pasos de la síntesis de T[SH]₂, en *T. thermophila* podría existir una única enzima (más similar a GspS) capaz de catalizar también ambas fases de la síntesis de T[SH]₂.
- 11) Como consecuencia de la presencia del sistema antioxidante T[SH]₂ / TryR en el ciliado *T. thermophila*, el modelo actual sobre la historia evolutiva de las TrySs / GspSs propuesto por varios autores ha de modificarse. El nuevo modelo que proponemos implica que la duplicación y diversificación génica que originó el gen TryS a partir del gen *GspS*, ambos con una función catalítica diferente y originando T[SH]₂, surgió en un ancestro común para los kinetoplástidos y alveolados. Posteriormente, tanto en algunos tripanosomátidos como ciliados se pudo perder la copia del gen *GspS* (como en *T. brucei*) o la copia del gen *TryS* (como en *T. thermophila*), pudiendo una sola enzima (TryS o GspS) llevar a cabo ambas fases de la síntesis de T[SH]₂.

Introducción

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Resumen de resultados

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

Introducción

Objetivos

Materiales y
Métodos

Resultados

Discusión

Resumen de
resultados

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

Bibliografía

- Adamis, P. D.; Gomes, D. S.; Pinto, M. L.; Panek, A. D. and Eleutherio E. C. (2004). The role of glutathione transferases in cadmium stress. Toxicology Letters **154**(1-2): 81-88.
- Ahamed, M. and Siddiqui, M. K. (2007). Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. Clinica Chimica Acta **383**(1-2): 57-64.
- Ahmad, H.; Tijerina, M. T. and Tobola, A. S. (1997). Preferential overexpression of a class MU glutathione S-transferase subunit in mouse liver by myristicin. Biochemical and Biophysical Research Communications Commun **236**(3): 825-828.
- Alag, R.; Bharatham, N.; Dong, A.; Hills, T.; Harikishore, A.; Widjaja, A. A.; Shochat, S. G.; Hui, R. and Yoon, H. S. (2009). Crystallographic structure of the tetratricopeptide repeat domain of *Plasmodium falciparum* FKBP35 and its molecular interaction with Hsp90 C-terminal pentapeptide. Protein Science **18**:2115-2124.
- Alcolea, P. J.; Alonso, A. and Larraga, V. (2011). Genome-wide gene expression profile induced by exposure to cadmium acetate in *Leishmania infantum* promastigotes. International Microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology **14**(1):1-11.
- Alcolea, P. J.; Alonso, A. and Larraga, V. (2010). Proteome profiling of *Leishmania infantum* promastigotes. The Journal of Eukaryotic Microbiology **58**(4):352-358.
- Alger, H. M. and Williams, D. L. (2002). The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. Molecular and Biochemical Parasitology **121**(1): 129-319.
- Allocati, N.; Federici, L.; Masulli, M. and Di Ilio, C. (2009). Glutathione transferases in bacteria. The FEBS Journal **276**(1): 58-75.

Bibliografía

- Amaro, F.; Ruotolo, R.; Martín-González, A.; Faccini, A.; Ottonello, S. and Gutiérrez, J.C. (2009). A pseudo-phytochelatin synthase in the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP **149**(4):598-604
- Amaro, F.; de Lucas, M. P.; Martín-González, A. and Gutiérrez, J. C. (2008). Two new members of the *Tetrahymena* multi-stress-inducible metallothionein family: Characterization and expression analysis of *T. rostrata* Cd/Cu metallothionein genes. Gene **423**: 85-91.
- Aposhian, H.V. and Aposhian, M.M. (2006). Arsenic toxicology: five questions. Chemical Research in Toxicology **19**(1): 1-15.
- Aposhian, H.V.; Zakharyan, R.A.; Avram, M.D.; Sampayo-Reyes, A. and Wollenberg, M.L. (2004). A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. Toxicology and Applied Pharmacology **198**: 327-335.
- Arca, P.; Hardisson, C. and Suarez, J. E. (1990). Purification of a glutathione S-transferase that mediates fosfomycin resistance in bacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **34**(5): 844-848.
- Ariyanayagam, M. R.; Oza, S. L.; Guthrie, M. L. and Fairlamb, A. H. (2005). Phenotypic analysis of trypanothione synthetase knockdown in the African trypanosome. The Biochemical Journal **391**(Pt 2): 425-432.
- Ariyanayagam, M. R. and Fairlamb, A. H. (2001). Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. Molecular and Biochemical Parasitology **115**(2): 189-198.
- Armstrong, R. N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. Chemical Research in Toxicology **10**(1): 2-18.
- Arner, E. S. (2009). Focus on mammalian thioredoxin reductases -- important selenoproteins with versatile functions. Biochimica et Biophysica Acta **1790**(6):495-526.
- Arner, E. S. and Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. European Journal of Biochemistry **267**(20): 6102-6109.
- Arner, E. S.; Bjornstedt, M. and Holmgren, A. (1995). 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene is an irreversible inhibitor of human thioredoxin reductase. Loss of thioredoxin disulfide reductase activity is accompanied by a large increase in NADPH oxidase activity. The Journal of Biological Chemistry **270**(8): 3479-3482.
- Arrigo, A. P. (1999). Gene expression and the thiol redox state. Free Radical Biology & Medicine **27**(9-10): 936-944.

- Arthur, J. R. (2000). The glutathione peroxidases. Cellular and Molecular Life Sciences **57**(13-14): 1825-1835.
- Ashida, H.; Sawa, Y. and Shibata, H. (2005). Cloning, biochemical and phylogenetic characterizations of gamma-glutamylcysteine synthetase from *Anabaena* sp. PCC 7120. Plant & Cell Physiology **46**(4): 557-562.
- Atzori, L.; Dypbukt, J. M.; Sundqvist, K.; Cotgreave, I.; Edman, C. C.; Moldéus, P. and Grafström, R. C. (1990). Growth-associated modifications of low-molecular-weight thiols and protein sulfhydryls in human bronchial fibroblasts. Journal of Cellular Physiology **143**(1): p. 165-171.
- Aury, J. M.; Jaillon, O.; Duret, L.; Noel, B.; Jubin, C.; Porcel, B. M.; Ségurens, B.; Daubin, V.; Anthouard, V.; Aiach, N.; Arnaiz, O.; Billaut, A.; Beisson, J.; Blanc, I.; Bouhouche, K.; Câmara, F.; Duharcourt, S.; Guigo, R.; Gogendeau, D.; Katinka, M.; Keller, A. M.; Kissmehl, R.; Klotz, C.; Koll, F.; Le Mouél, A.; Lepère, G.; Malinsky, S.; Nowacki, M.; Nowak, J. K.; Plattner, H.; Poulain, J.; Ruiz, F.; Serrano, V.; Zagulski, M.; Dessen, P.; Bétermier, M.; Weissenbach, J.; Scarpelli, C.; Schächter, V.; Sperling, L.; Meyer, E.; Cohen, J. and Wincker P. (2006). Global trends of the whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. Nature **444**: 171-178
- Avval, F. Z. and Holmgren, A. (2009). Molecular mechanisms of thioredoxin and glutaredoxin as hydrogen donors for Mammalian S phase ribonucleotide reductase. The Journal of Biological Chemistry **284**(13): 8233-8240.
- Axarli, I. A.; Rigden, D. J. and Labrou, N. E. (2004). Characterization of the ligandin site of maize glutathione S-transferase I. The Biochemical Journal **382**(Pt 3): 885-893.
- Baek, Y. U.; Kim, Y. R.; Yim, H. S. and Kang, S. O. (2004). Disruption of gamma-glutamylcysteine synthetase results in absolute glutathione auxotrophy and apoptosis in *Candida albicans*. FEBS Letters **556**(1-3): 47-52.
- Baldauf, S. L. (2003). The deep roots of eukaryotes. Science **300**: 1703-1706.
- Bauer, H.; Gromer, S.; Urbani, A.; Schnolzer, M.; Schirmer, R. H. and Muller, H. M. (2003). Thioredoxin reductase from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. European Journal of Biochemistry / FEBS **270**(21): 4272-4281.
- Baumgartner, H. K.; Gerasimenko, J. V.; Thorne, C.; Ferdek, P.; Pozzan, T.; Tepikin, A. V.; Petersen, O. H.; Sutton, R.; Watson, A. J. and Gerasimenko, O. V. (2009). Calcium elevation in mitochondria is the main Ca²⁺ requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. The Journal of Biological Chemistry **284**(31): 20796-20803.

Bibliografía

- Bayoumi, A.E.; Perez-Pertejo, Y.; Ordóñez, C.; Reguera, R. M.; Cubría, J.C.; Balaña-Fouce, R. and Ordóñez, D. (2000). Alterations on polyamine content and glutathione metabolism induced by different concentrations of paraquat in CHO-K1 cells. Toxicology in Vitro : an international journal published in association with BIBRA **14**(3):211-217.
- Bell, S. G. and Vallee, B. L. (2009). The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. Chembiochem : a European Journal of Chemical Biology **10**(1): 55-62.
- Bentley, R. and Chasteen, T. G. (2002). Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR **66**(2):250-271.
- Berggren, M.; Gallegos, A.; Gasdaska, J. R.; Gasdaska, P. Y.; Warneke, J. and Powis, G. (1996). Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia. Anticancer Research **16**(6B): 3459-3466.
- Bertin, G. and Averbeck, D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). Biochimie **88**(11): 1549-1559.
- Biagini, G. A.; Park, J. H.; Lloyd, D. and Edwards, M. R. (2001). The antioxidant potential of pyruvate in the amitochondriate diplomonads *Giardia intestinalis* and *Hexamita inflata*. Microbiology **147**(Pt 12):3359-3365.
- Bjornstedt, M.; Hamberg, M.; Kumar, S.; Xue, J. and Holmgren, A. (1995). Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocysteine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. The Journal of Biological Chemistry **270**(20): 11761-11764.
- Black, A. T.; Gray, J. P.; Shakarjian, M. P.; Laskin, D. L.; Heck, D. E. and Laskin, J. D. (2008). Increased oxidative stress and antioxidant expression in mouse keratinocytes following exposure to paraquat. Toxicology and Applied Pharmacology **231**(3):384-392.
- Board, P. G.; Coggan, M.; Chelvanayagam, G.; Easteal, S.; Jermin, L. S.; Schulte, G. K.; Danley, D. E.; Hoth, L. R.; Griffor, M. C.; Kamath, A. V.; Rosner, M. H.; Chrnyk, B. A.; Perregaux, D. E.; Gabel, C. A.; Geoghegan, K. F. and Pandit, J. (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. The Journal of Biological Chemistry **275**(32): 24798-24806.
- Bollinger, J. M.; Kwon, D. S.; Huisman, G. W.; Kolter, R. and Walsh, C. T. (1995). Glutathionylspermidine metabolism in *Escherichia coli*. Purification, cloning, overproduction, and characterization of a bifunctional glutathionylspermidine synthetase/amidase. The Journal of Biological Chemistry **270**(23): 14031-14041.

- Booth, J.; Boyland, E. and Sims, P. (1961). An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. Biochemical Journal **79**(3): 516-524.
- Borden, K. L. (1998). RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains. Biochemistry and Cell Biology **76**(2-3): 351-358.
- Borden, K. L. B. and Freemont, P. S. (1996). The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. Current Opinion in Structural Biology **6**: 395-401.
- Bowes, T. J. and Gupta, R. S. (2005) Induction of mitochondrial fusion by cysteine-alkylators ethacrynic acid and N-ethylmaleimide. Journal of Cellular Physiology **202**(3):796-804
- Bresell, A.; Weinander, R.; Lundqvist, G.; Raza, H.; Shimoji, M.; Sun, T. H.; Balk, L.; Wiklund, R.; Eriksson, J.; Jansson, C.; Persson, B.; Jakobsson, P. J. and Morgenstern, R. (2005). Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. The FEBS Journal **272**(7): 1688-1703.
- Bridges, D. J.; Bunn, J.; van Mourik, J. A.; Grau, G.; Preston, R. J.; Molyneux, M.; Combes, V.; O'Donnell, J. S.; de Laat, B. and Craig, A. (2010). Rapid activation of endothelial cells enables *Plasmodium falciparum* adhesion to platelet-decorated von Willebrand factor strings. Blood **115**(7):1472-1474.
- Burmeister, C.; Lüersen, K.; Heinick, A.; Hussein, A.; Domagalski, M.; Walter, R. D. and Liebau, E. (2008). Oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*: protective effects of the Omega class glutathione transferase (GSTO-1). " FASEB Journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **22**: 343-354.
- Burns, C.; Geraghty, R.; Neville, C.; Murphy, A.; Kavanagh, K. and Doyle, S. (2005). Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from *Aspergillus fumigatus*. Fungal Genetics and Biology **42**(4): 319-327.
- Carvalho, C. M.; Chew, E. H.; Hashemy, S. I.; Lu, J. and Holmgren, A. (2008). Inhibition of the human thioredoxin system. A molecular mechanism of mercury toxicity. " The Journal of Biological Chemistry **283**(18): 11913-11923.
- Castello, P. R.; Drechsel, D. A. and Patel, M. (2007). Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain. The Journal of Biological Chemistry **282**(19):14186-14193.
- Castro, F. A.; Mariani, D.; Panek, A. D.; Eleutherio, E. C. and Pereira, M. D. (2008). Cytotoxicity mechanism of two naphthoquinones (menadione and plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS ONE **3**(12): e3999.

Bibliografía

- Castro, F. A.; Herdeiro, R. S.; Panek, A. D.; Eleutherio, E. C. and Pereira, M. D. (2007). Menadione stress in *Saccharomyces cerevisiae* strains deficient in the glutathione transferases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1770**(2):213-220.
- Catalá, A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids* **157**(1): 1-11.
- Cavalier-Smith, T. (1999). Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* **46**: 347-366.
- Cavalier-Smith, T. (1991). Cell diversification in heterotrophic flagellates. En: Patterson D., Larsen J. (eds). *The Biology of free-living heterotrophic flagellates*. Oxford University Press. NY. pp. 113-131.
- Chauhan, S. C.; Padmanabhan, P. K. and Madhubala, R. (2008). Glyoxalase pathway of trypanosomatid parasites: a promising chemotherapeutic target. *Current Drug Targets* **9**(11): 957-965.
- Chiaverini, N. and De Ley, M (2010). Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage. *Free Radical Research* **44**(6):605-613
- Chiou, T. J.; Chu, S. T. and Tzeng, W. F. (2003). Protection of cells from menadione-induced apoptosis by inhibition of lipid peroxidation. *Toxicology* **191**(2-3):77-88.
- Chiou, T. J. and Tzeng, W. F. (2000). The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. *Toxicology* **154**(1-3): 75-84.
- Choi, C. H. (2003). Cloning and functional study of a novel human metallothionein-I isoform induced by paraquat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**(2):236-240.
- Chuang, Y. Y.; Chen, Y.; Gadiseti; Chandramouli, V. R.; Cook, J. A.; Coffin, D.; Tsai, M. H.; DeGraff, W.; Yan, H.; Zhao, S.; Russo, A.; Liu, E. T. and Mitchell, J. B. (2002). Gene expression after treatment with hydrogen peroxide, menadione, or t-butyl hydroperoxide in breast cancer cells. *Cancer Research* **62**(21):6246-6254.
- Chung, S. H.; Chung, S. M.; Lee, J. Y.; Kim, S. R.; Park, K. S. and Chung, J. H. (1999). The biological significance of non-enzymatic reaction of menadione with plasma thiols: enhancement of menadione-induced cytotoxicity to platelets by the presence of blood plasma. *FEBS letters* **449**(2-3):235-240.

- Circu, M. L. and Aw, T. Y. (2008). Glutathione and apoptosis. Free Radical Research **42**(8): 689-706.
- Clemens, S. (2006). Evolution and function of phytochelatin synthases. Journal of Plant Physiology **163**(3):319-332.
- Clemens, S.; Schroeder, J. I. and Degenkolb, T. (2001). *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. European Journal of Biochemistry / FEBS **268**(13):3640-3643.
- Clemens, S.; Kim, E. J.; Neumann, D. and Schroeder, J. I. (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. The EMBO Journal **18**(12):3325-3333.
- Cochemé, H. M. and Murphy, M. P. (2008). Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. The Journal of Biological Chemistry **283**(4):1786-1798.
- Cojocel, C.; Novotny, L. and Vachalkova, A. (2008). Mutagenic and carcinogenic potential of menadione. Neoplasma **53**(4):316-323.
- Colotti, G. and Ilari, A. (2011). Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. Amino Acids **40**: 269-285.
- Comini, M.; Menge, U.; Wissing, J. and Flohe, L. (2005). Trypanothione synthesis in *Crithidia* revisited. The Journal of Biological Chemistry **280**(8): 6850-6860.
- Conrad, C. C.; Grabowski, D. T.; Walter, C. A.; Sabia, M. and Richardson, A. (2000). Using MT(-/-) mice to study metallothionein and oxidative stress. Free Radical Biology & Medicine **28**(3):447-462.
- Copley, S. D. and Dhillon, J. K. (2002). Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes. Genome Biology **3**(5): research0025.
- Coyne R. S.; Thiagarajan, M.; Jones, K. M.; Wortman, J. R.; Tallon, L. J.; Haas, B. J.; Cassidy-Hanley, D. M.; Wiley, E. A.; Smith, J. J.; Collins, K.; Lee, S. R.; Couvillion, M. T.; Liu, Y.; Garg, J.; Pearlman, R. E.; Hamilton, E. P.; Orias, E.; Eisen, J. A. and Methé, B. A. (2008). Refined annotation and assembly of the *Tetrahymena thermophila* genome sequence through EST analysis, comparative genomic hybridization, and targeted gap closure. BMC Genomics **9**:562.
- Criddle, D. N.; Gillies, S.; Baumgartner-Wilson, H. K.; Jaffar, M.; Chinje, E. C.; Passmore, S.; Chvanov, M.; Barrow, S.; Gerasimenko, O. V.; Tepikin, A. V.; Sutton, R. and Petersen, O. H. (2006). Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. The Journal of Biological Chemistry **281**(52):40485-40492.
- Cubas, L. L.; Martín-González, A. y Gutiérrez, J. C. (2011). La familia de glutatión-peroxidasas (GPx) de *Tetrahymena thermophila*: un análisis de los niveles de expresión bajo diferentes condiciones de estrés. XXIII Congreso Nacional de Microbiología (SEM). pp. 111. Salamanca.

Bibliografía

- Cunningham, M. L. and Fairlamb, A. H. (1995). Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. European Journal of Biochemistry **230**: 460-468.
- Cuypers, A.; Plusquin, M.; Remans, T.; Jozefczak, M.; Keunen, E.; Gielen, H.; Opdenakker, K.; Nair, A.R.; Munters, E.; Artois, T. J.; Nawrot, T.; Vangronsveld, J. and Smeets, K. (2010) Cadmium stress: an oxidative challenge. Biometals **23**(5):927-940
- Dalton, T. P.; Shertzer, H. G. and Puga, A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. Annual Review of Pharmacology and Toxicology **39**: 67-101.
- Das, K. C.; Guo, X. L. and White, C. W. (1999). Induction of thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in lungs of newborn primates by oxygen. The American Journal of Physiology **276**(3 Pt 1): L530-9.
- Das, A. K.; Cohen, P. T. W. and Barford, D. (1998). The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. The EMBO Journal **17**: 1192-1199.
- Deffieu, M.; Bhatia-Kissová, I.; Salin, B.; Galinier, A.; Manon, S. and Camougrand, N. (2009). Glutathione participates in the regulation of mitophagy in yeast. The Journal of Biological Chemistry **284**(22):14828-14837
- Del Razo, L. M.; Quintanilla-Vega, B.; Brambila-Colombres, E.; Calderón-Aranda, E. S.; Manno, M. and Albores, A. (2001). Stress proteins induced by arsenic. Toxicology and Applied Pharmacology **177**(2): p. 132-148.
- Derby, M. C.; Lieu, Z. Z.; Brown, D.; Stow, J. L.; Goud, B. and Gleeson, P. A. (2007). The trans-Golgi network golgin, GCC185, is required for endosome-to-Golgi transport and maintenance of Golgi structure. Traffic **8**(6): 758-773.
- Díaz, S.; Amaro, F.; Rico, D.; Campos, V.; Benítez, L.; Martín-González, A.; Hamilton, E. P.; Orias, E. and Gutiérrez, J. C. (2007). Tetrahymena metallothioneins fall into two discrete subfamilies. PLoS One **2**(3):e291.
- Dickinson, D. A.; Levonen, A. L.; Moellering, D. R.; Arnold, E. K.; Zhang, H.; Darley-Usmar, V. M. and Forman, H. J. (2004). Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. Free Radical Biology & Medicine **37**(8): 1152-1159.
- Dixon, D. P.; Davis, B. G. and Edwards, R. (2002). Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. The Journal of Biological Chemistry **277**(34): 30859-30869.

- Doolittle, W. F. (1998). You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. Trends in Genetics :TIG **14**(8):307-311.
- Dormeyer, M.; Reckenfelderbaumer, N.; Ludemann, H. and Krauth-Siegel, R. L. (2001). Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. The Journal of Biological Chemistry **276**(14): 10602-10606.
- Dourado, D. F.; Fernandes, P. A. and Ramos, M. J. (2008). Mammalian cytosolic glutathione transferases. Current Protein & Peptide Science **9**(4): 325-337.
- Dringen, R. and Gutterer, J. M. (2002). Glutathione reductase from bovine brain. Methods in Enzymology **348**: 281-288.
- Dröge, W. (2003). Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological Reviews **82**: 47-95.
- Dusre, L.; Mimnaugh, E. G.; Myers, C. E. and Sinha, B K. (1989). Potentiation of doxorubicin cytotoxicity by buthionine sulfoximine in multidrug-resistant human breast tumor cells. Cancer Research **49**(3): p. 511-515.
- Eady, J. J.; Orta, T.; Dennis, M. F.; Stratford, M.R. and Peacock, J. H. (1995). Glutathione determination by the Tietze enzymatic recycling assay and its relationship to cellular radiation response. British Journal of Cancer **72**(5): p. 1089-1095.
- Eaton, D. L. and Bammler, T. K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. Toxicological Sciences : an official Journal of the Society of Toxicology **49**(2): 156-164.
- Edwards, R. and Dixon, D. P. (2005). Plant glutathione transferases. Methods in enzymology **401**: 169-186.
- Eisen, J. A.; Coyne, R. S.; Wu, M.; Wu, D.; Thiagarajan, M.; Wortman, J. R.; Badger, J. H.; Ren, Q.; Amedeo, P.; Jones, K. M.; Tallon, L. J.; Delcher, A. L.; Salzberg, S. L.; Silva, J. C.; Haas, B. J.; Majoros, W. H.; Farzad, M.; Carlton, J. M.; Smith, R. K. Jr.; Garg, J.; Pearlman, R. E.; Karrer, K. M.; Sun, L.; Manning, G.; Elde, N. C.; Turkewitz, A. P.; Asai, D. J.; Wilkes, D. E.; Wang, Y.; Cai, H.; Collins, K.; Stewart, B. A.; Lee, S. R.; Wilamowska, K.; Weinberg, Z.; Ruzzo, W. L.; Wloga, D.; Gaertig, J.; Frankel, J.; Tsao, C. C.; Gorovsky, M. A.; Keeling, P. J.; Waller, R. F.; Patron, N. J.; Cherry, J. M.; Stover, N. A.; Krieger, C. J.; del Toro, C.; Ryder, H. F.; Williamson, S. C.; Barbeau, R. A.; Hamilton, E. P. and Orias, E. (2006). Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. PLoS Biology **4**(9):e286.

Bibliografía

- El-Sharakly, A. S.; Newairy, A. A.; Badreldeen, M. M.; Eweda, S. M. and Sheweita, S. A. (2007). Protective role of selenium against renal toxicity induced by cadmium in rats. Toxicology **235**(3): 185-193.
- Engle, M. R.; Singh, S. P.; Czernik, P. J.; Gaddy, D.; Montague, D. C.; Ceci, J. D.; Yang, Y.; Awasthi, S.; Awasthi, Y. C. and Zimniak, P. (2004). Physiological role of mGSTA4-4, a glutathione S-transferase metabolizing 4-hydroxynonenal: generation and analysis of mGsta4 null mouse. Toxicology and Applied Pharmacology **194**(3): 296-308.
- Erickson, A. M.; Nevarea, Z.; Gipp, J. J. and Mulcahy, R. T. (2002). Identification of a variant antioxidant response element in the promoter of the human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene. Revision of the ARE consensus sequence." The Journal of Biological Chemistry **277**(34): 30730-30737.
- Fahey, R. C. (2001). Novel thiols of prokaryotes. Annual Review of Microbiology **55**: 333-356.
- Fairlamb, A. H.; Henderson, G. B.; Bacchi, C. G. and Cerami, A. (1987). In vivo effects of difluoromethylornithine on trypanothione and polyamine levels in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. Molecular and Biochemical Parasitology **24**(2): 185-191.
- Fairlamb, A. H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B. T. and Cerami, A. (1985). Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. Science **227**(4693): 1485-1487.
- Fang, S.; Lorick, K. L.; Jensen, J. P. and Weissman, A. M. (2003). RING finger ubiquitin protein ligases: implications for tumorigenesis, metastasis and for molecular targets in cancer. Seminars in Cancer Biology **13**: 5-14.
- Farmen, E.; Olsvik, P. A.; Berntssen, M. H.; Hylland, K. and Tollefsen, K. E. (2010). Oxidative stress responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes exposed to pro-oxidants and a complex environmental sample. Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology :CBP **151**(4): 431-438.
- Feng, L.; Miao, W. and Wu, Y. (2007). Differentially expressed genes of *Tetrahymena thermophila* in response to tributyltin (TBT) identified by suppression subtractive hybridization and real time quantitative PCR. Aquatic Toxicology **81**(1): 99-105.
- Ferrari, D. M. and Soling, H. D. (1999). The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. The Biochemical Journal **339** (Pt 1): 1-10.

- Fillingham, J. S.; Chilcoat, N. D.; Turkewitz, A. P.; Orias, E.; Reith, M. and Pearlman, R. E. (2002). Analysis of expressed sequence tags (ESTs) in the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. The Journal of Eukaryotic Microbiology **49**(2): 99-107.
- Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature **408**(6809): 239-247.
- Forman, H. J.; Zhang, H. and Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. Molecular Aspects of Medicine **30**(1-2): 1-12.
- Formigari, A.; Irato, P. and Santon, A. (2007). Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. Comparative Biochemistry and Physiology **146**(4): 443-459.
- Franco, R. and Cidlowski, J. A. (2012). Glutathione efflux and cell death. Antioxid Redox Signal **17**:1694-16713.
- Franco, R.; Sanchez-Olea, R.; Reyes-Reyes, E. M. and Panayiotidis, M. I. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. Mutation Research **674**(1-2): 3-22.
- Franklin, C. C.; Backos, D. S.; Mohar, I.; White, C. C.; Forman, H. J. and Kavanagh, T. J. (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. Molecular Aspects of Medicine **30**(1-2): 86-98.
- Fraser, J. A.; Saunders, R. D. and McLellan, L. I. (2002). *Drosophila melanogaster* glutamate-cysteine ligase activity is regulated by a modifier subunit with a mechanism of action similar to that of the mammalian form. The Journal of Biological Chemistry **277**(2): 1158-1165.
- Freemont, P. S. (2000). Ubiquitination: RING for destruction?. Current Biology **10**: 84-87.
- Fritz-Wolf, K.; Becker, A.; Rahlfs, S.; Harwaldt, P.; Schirmer, R. H.; Kabsch, W. and Becker, K. (2003). X-ray structure of glutathione S-transferase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(24):13821-13826.
- Frova, C. (2006). Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. Biomolecular Engineering **23**(4): 149-169.
- Fujii, T.; Hamaoka, R.; Fujii, J. and Taniguchi, N. (2000). Redox capacity of cells affects inactivation of glutathione reductase by nitrosative stress. Archives of Biochemistry and Biophysics **378**(1): 123-130.

Bibliografía

- Fyfe, P.K.; Oza, S. L.; Fairlamb, A. H. and Hunter, W. N. (2008). *Leishmania* trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. The Journal of Biological Chemistry **283**(25): 17672-17680.
- Gadd, G. M. (2000). Heavy metal pollutants: environmental and biotechnological aspects. Encyclopedia of Microbiology. Lederberg. New York. 2: 607-617.
- Gaetke, L. M. and Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. Toxicology **189**(1-2): 147-163.
- Gallego, A.; Martin-Gonzalez, A.; Ortega, R. and Gutierrez, J. C. (2007) Flow cytometry assessment of cytotoxicity and reactive oxygen species generation by single and binary mixtures of cadmium, zinc and copper on populations of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. Chemosphere **68**(4):647-661
- Gallogly, M. M. and Mieyal, J. J. (2007). Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. Current Opinion in Pharmacology **7**(4): 381-391.
- García-Ruiz, C.; Marí, M.; Morales, A.; Colell, A.; Ardite, E. and Fernández-Checa, J. C. (2000). Human placenta sphingomyelinase, an exogenous acidic pH-optimum sphingomyelinase, induces oxidative stress, glutathione depletion, and apoptosis in rat hepatocytes. Hepatology **32**(1):56-65.
- Gasdaska, P. Y.; Berggren, M. M.; Berry, M. J. and Powis, G. (1999). Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase. FEBS letters **442**(1): 105-111.
- Gerasimenko, J. V.; Gerasimenko, O. V.; Palejwala, A.; Tepikin, A. V.; Petersen, O. H. and Watson, A. J. (2002). Menadione-induced apoptosis: roles of cytosolic Ca(2+) elevations and the mitochondrial permeability transition pore. Journal of Cell Science **115**(Pt 3):485-497.
- Ghedini, E.; Wang, S.; Spiro, D.; Caler, E.; Zhao, Q.; Crabtree, J.; Allen, J. E.; Delcher, A. L.; Guiliano, D. B.; Miranda-Saavedra, D.; Angiuoli, S. V.; Creasy, T.; Amedeo, P.; Haas, B.; El-Sayed, N. M.; Wortman, J. R.; Feldblyum, T.; Tallon, L.; Schatz, M.; Shumway, M.; Koo, H. ; Salzberg, S. L.; Schobel, S.; Perte, M.; Pop, M.; White, O.; Barton, G. J.; Carlow, C. K.; Crawford, M. J.; Daub, J.; Dimmic, M. W.; Estes, C. F.; Foster, J. M.; Ganatra, M.; Gregory, W. F.; Johnson, N. M.; Jin, J.; Komuniecki, R.; Korf, I.; Kumar, S. ; Laney, S.; Li, B. W.; Li, W.; Lindblom, T. H.; Lustigman, S.; Ma, D.; Maina, C. V.; Martin, D. M.; McCarter, J. P.; McReynolds, L.; Mitreva, M. ; Nutman, T. B.; Parkinson, J.; Peregrin-Alvarez, J. M.; Poole, C.; Ren, Q.; Saunders, L.; Sluder, A. E.; Smith, K.; Stanke, M.; Unnasch, T. R.; Ware, J.; Wei, A. D.; Weil, G.; Williams, D. J.; Zhang, Y.; Williams, S. A.; Fraser-Liggett, C.; Slatko, B.; Blaxter, M. L. and Scott, A. L. (2007). Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. Science **317**(5845): 1756-1760.

- Gil, H. W.; Oh, M.H.; Woo, K.M.; Lee, E. Y.; Oh, M. H. and Hong, S. Y. (2007). Relationship between pulmonary surfactant protein and lipid peroxidation in lung injury due to paraquat intoxication in rats. The Korean Journal of Internal Medicine **22**(2):67-72.
- Gillingham, A. K. and Munro, S. (2003). Long coiled-coil proteins and membrane traffic. Biochimica et Biophysica Acta **1641**(2-3): 71-85.
- Giustarini, D.; Campoccia, G.; Fanetti, G.; Rossi, R.; Giannerini, F.; Lusini, L. and Di Simplicio, P. (200) Minor thiols cysteine and cysteinylglycine regulate the competition between glutathione and protein SH groups in human platelets subjected to oxidative stress. Archives of Biochemistry and Biophysics **380**(1):1-10
- Gladyshev, V. N.; Krause, M.; Xu, X. M.; Korotkov, K. V.; Kryukov, G. V.; Sun, Q. A.; Lee, B. J.; Wootton, J. C. and Hatfield, D. L. (1999). Selenocysteine-containing thioredoxin reductase in *C. elegans*. Biochemical and Biophysical Research Communications **259**(2): 244-249.
- González-Polo, R.A.; Niso-Santano, M.; Ortiz-Ortiz, M.A.; Gómez-Martín, A.; Morán, J.M.; García-Rubio, L.; Francisco-Morcillo, J.; Zaragoza, C.; Soler, G. and Fuentes, J. M. (2007). Relationship between autophagy and apoptotic cell death in human neuroblastoma cells treated with paraquat: could autophagy be a “brake” in paraquat-induced apoptotic death? Autophagy **3**(4):366-367.
- Gopal, S.; Borovok, I.; Ofer, A.; Yanku, M.; Cohen, G.; Goebel, W.; Kreft, J. and Aharonowitz, Y. (2005). A multidomain fusion protein in *Listeria monocytogenes* catalyzes the two primary activities for glutathione biosynthesis. Journal of Bacteriology **187**(11): 3839-3847.
- Grant, C. M.; MacIver, F. H. and Dawes, I. W. (1997). Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. Molecular Biology of the Cell **8**(9): 1699-1707.
- Grant, C. M.; Collinson, L. P.; H. Roe, J. and Dawes, I. W. (1996). Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. Molecular Microbiology **21**(1): 171-179.
- Grant, B. and Greenwald, I. (1996). The *Caenorhabditis elegans* sel-1 gene, a negative regulator of lin-2 and glp-1, encodes a predicted extracellular protein. Genetics **143**: 237-247.
- Gray, J. P.; Heck, D. E.; Mishin, V.; Smith, P. J.; Hong, J. Y.; Thiruchelvam, M.; Cory-Slechta, D. A.; Laskin, D. L. and Laskin, J. D. (2007). Paraquat increases cyanide-insensitive respiration in murine lung epithelial cells by activating an NAD(P)H:paraquat oxidoreductase: identification of the enzyme as thioredoxin reductase. The Journal of Biological Chemistry **282**(11): 7939-7949.

Bibliografía

- Griffith, O.W. (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. Free Radical Biology & Medicine **27**(9-10): p. 922-935.
- Griffith, O.W. (1982) Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. The Journal of Biological Chemistry **257**: 13704-13712.
- Griffith, O.W. and Mulcahy, R. T. (1999). The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamyl-cysteine synthetase. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology **73**:209-267.
- Guimond, C.; Trudel, N.; Brochu, C.; Marquis, N.; El Fadili, A.; Peytavi, R.; Briand, G.; Richard, D.; Messier, N.; Papadopoulou, B.; Corbeil, J.; Bergeron, M. G.; Légaré, D. and Ouellette, M. (2003). Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. Nucleic Acids Research **31**(20): 5886-5896.
- Guo, L.; Fu, C. and Miao, W. (2008 a). Cloning, characterization, and gene expression analysis of a novel cadmium metallothionein gene in *Tetrahymena pigmentosa*. Gene **23**(1):29-35
- Guo, J.; Dai, X.; Xu, W. and Ma, M. (2008 b). Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. Chemosphere **72**(7):1020-1026.
- Gutiérrez, J.C.; Amaro, F.; Díaz, S.; de Francisco, P.; Cubas, L. L. and Martín-González, A. (2011). Ciliate metallothioneins: unique microbial eukaryotic heavy-metal-binder molecules. Journal of Biological Inorganic Chemistry : JBIC **16**(7):1025-1034
- Gutiérrez, J. C.; Amaro, F. and Martín-González, A. (2009). From heavy metal-binders to biosensors: ciliate metallothioneins discussed Bioessays **7**:805-816
- Haïdara, K.; Moffatt, P. and Denizeau, F. (1999). Metallothionein induction attenuates the effects of glutathione depletors in rat hepatocytes. Toxicological Sciences : an official journal of the Society of Toxicology **49**(2):297-305
- Halliwell, B. G. and Gutteridge, J.M.C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford. University Press
- Harris, J. M.; Meyer, D. J.; Coles, B. and Ketterer, B. (1991). A novel glutathione transferase (13-13) isolated from the matrix of rat liver mitochondria having structural similarity to class theta enzymes. Biochemical Journal **278** (Pt 1): 137-141.
- Hayes, J. D.; Flanagan, J. U. and Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology **45**: 51-88.

- Hayes, J. D. and McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. Free Radical Research **31**(4): 273-300.
- Hayes, J. D. and Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **30**(6): 445-600.
- Hell, R. (1997). Molecular physiology of plant sulfur metabolism. Planta **202**(2): 138-148.
- Henderson C. J. and Wolf, C. R. (2011). Knockout and transgenic mice in glutathione transferase research. Drug Metabolism Reviews **43**(2):152-164.
- Herbette, S.; Roeckel-Drevet, P. and Drevet, J. R. (2007). Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. FEBS letters **274**(9): 2163-2180.
- Hildebrandt, U.; Regvar, M. and Bothe, H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. Phytochemistry **68**: 139-146.
- Hiller, N.; Fritz-Wolf, K.; Deponte, M.; Wende, W.; Zimmermann, H. and Becker, K. (2006). *Plasmodium falciparum* glutathione S-transferase--structural and mechanistic studies on ligand binding and enzyme inhibition. Protein Science : a Publication of the Protein Society **15**(2):281-289.
- Hindley, J. (1983). DNA sequencing. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier Biochemical Press.
- Hirt, R. P.; Muller, S.; Embley, T. M. and Coombs, G. H. (2002). The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives. Trends in Parasitology **18**(7): 302-308.
- Holmgren, A. and Lu, J. (2010). Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. Biochemical and Biophysical Research Communications **396**: 120-124.
- Holmgren, A.; Johansson, C.; Berndt, C.; Lonn, M. E.; Hudemann, C. and Lillig, C. H. (2005). Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. Biochemical Society Transactions **33**(Pt 6): 1375-1377.
- Holmgren, A. and Aslund, F. (1995). Glutaredoxin. Methods in Enzymology **252**: 283-292.
- Holmgren, A. (1981). Regulation of ribonucleotide reductase. Current Topics in Cellular Regulation **19**: p. 47-76.

Bibliografía

- Holmgren, A. (1977). Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction. The Journal of Biological Chemistry **252**(13): 4600-4606.
- Huang, C. F.; Wang, Y. R.; Yen, C. H.; Chou, S. H. and Lau Y. T. (2006). Paraquat-induced lipid peroxidation: effects of ovariectomy and estrogen receptor antagonist. The Chinese Journal of Physiology **49**(3):141-146
- Huang, C. S.; Anderson, M. E. and Meister, A. (1993). Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. The Journal of Biological Chemistry **268**(27): 20578-20583.
- Huynh, T. T.; Huynh, V. T.; Harmon, M. A. and Phillips, M. A. (2003). Gene knockdown of gamma-glutamylcysteine synthetase by RNAi in the parasitic protozoa *Trypanosoma brucei* demonstrates that it is an essential enzyme. The Journal of Biological Chemistry **278**(41): 39794-39800.
- Ikebuchi, M.; Kashiwagi, A.; Asahina, T.; Tanaka, Y.; Takagi, Y.; Nishio, Y.; Hidaka, H.; Kikkawa, R. and Shigeta, Y. (1993). Effect of medium pH on glutathione redox cycle in cultured human umbilical vein endothelial cells. Metabolism: Clinical and Experimental **42**(9):1121-1126.
- Iles, K. E. and Liu, R. M. (2005). Mechanisms of glutamate cysteine ligase (GCL) induction by 4-hydroxynonenal. Free Radical Biology & Medicine **38**(5):547-556.
- Irigoin, F.; Cibils, L.; Comini, M. A.; Wilkinson, S. R.; Flohe, L. and Radi, R. (2008). Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. Free Radical Biology & Medicine **45**(6): 733-742.
- Ivanina, A. V.; Cherkasov, A. S. and Sokolova, I. M. (2008). Effects of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. The Journal of Experimental Biology **211**(Pt 4):577-586
- Jakobsson, P.-J.; Morgenstern, R.; Mancini, J.; Ford-Hutchinson, A.; and Persson B. (2000). Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **161**: 20-24.
- Jakobsson, P. J.; Morgenstern, R.; Mancini, J.; Ford-Hutchinson, A. and Persson, B. (1999). Common structural features of MAPEG -- a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. Protein Science **8**(3): 689-692.

- Jamers, A. and De Coen, W. (2010). Effect assessment of the herbicide paraquat on a green alga using differential gene expression and biochemical biomarkers. Environmental Toxicology and Chemistry. **29**:893-901
- Janowiak, B. E.; Hayward, M. A.; Peterson, F. C.; Volkman, B. F. and Griffith, O. W. (2006). Gamma-glutamylcysteine synthetase-glutathione synthetase: domain structure and identification of residues important in substrate and glutathione binding. Biochemistry **45**(35): 10461-10473.
- Janowiak, B. E. and Griffith, O. W. (2005). Glutathione synthesis in *Streptococcus agalactiae*. One protein accounts for gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase activities. The Journal of Biological Chemistry **280**(12): 11829-11839.
- Jacquot, J-P.; Eklund, H.; Rouhier, N. and Schürman, P. (2009). Structural and evolutionary aspects of thioredoxin reductases in photosynthetic organisms. Trends in Plant Science **14**: 336-343.
- Jeddi, F.; Piarroux, R. and Mary, C. (2011). Antimony resistance in *Leishmania*, focusing on experimental research. Journal of Tropical Medicine doi: 10.1155/2011/695382.
- Jez, J. M.; Cahoon, R. E. and Chen, S. (2004). *Arabidopsis thaliana* glutamate-cysteine ligase: functional properties, kinetic mechanism, and regulation of activity. The Journal of Biological Chemistry **279**(32):33463-33470.
- Ji, X.; von Rosenvinge, E. C.; Johnson, W. W.; Tomarev, S. I.; Piatigorsky, J.; Armstrong, R. N. and Gilliland, G. L. (1995). Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of a sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. Biochemistry **34**(16): 5317-5328.
- Jockers-Scherubl, M. C.; Schirmer, R. H. and Krauth-Siegel, R. L. (1989). Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. European Journal of Biochemistry **180**(2): 267-272.
- Johansson, C.; Lillig, C. H. and Holmgren, A. (2004). Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase. The Journal of Biological Chemistry **279**(9): 7537-7543.
- Jomova, K.; Vondrakova, D.; Lawson, M. and Valko, M. (2010). Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. Molecular and Cellular Biochemistry **345**(1-2):91-104
- Jones, D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. American Journal of Physiology. Cell Physiology **295**(4): C849-68.
- Jones, D. P. (2006). Redefining oxidative stress. Antioxidants & Redox Signaling **8**(9-10): 1865-79.

Bibliografía

- Jos, A.; Cameán, A. M.; Pflugmacher, S. and Segner, H. (2009). The antioxidant glutathione in the fish cell lines EPC and BCF-2: response to model pro-oxidants as measured by three different fluorescent dyes. Toxicology In Vitro **23**(3): 546-553.
- Joseph, P. (2009). Mechanisms of cadmium carcinogenesis. Toxicology and Applied Pharmacology **238**(3):272-279
- Jowsey, I. R. and Hayes, J. D. (2006). Mammalian Glutathione S-Transferase Genes Structure and Regulation. Toxicology of Glutathione Transferases Edited by Yogesh C. Awasthi Informa Healthcare 27-46
- Jowsey, I. R.; Thomson, R. E.; Orton, T. C.; Elcombe, C. R. and Hayes, J. D. (2003). Biochemical and genetic characterization of a murine class Kappa glutathione S-transferase. The Biochemical Journal **373**(Pt 2): 559-569.
- Kang, Y. J. (1997). Cellular and molecular mechanisms of metal toxicities. Handbook of Human Toxicology. Massaro. New York, CRC Press, Boca Ratón: 256-284.
- Kanzok, S. M.; Fechner, A.; Bauer, H.; Ulschmid, J. K.; M. Muller, H.; Botella-Muñoz, J.; Schneuwly, S.; Schirmer, R. and Becker, K. (2001). Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. Science **291**(5504): 643-646.
- Kapoor, G.; Banyal, H. S. (2009). Glutathione reductase and thioredoxin reductase: novel antioxidant enzymes from *Plasmodium berghei*. The Korean Journal of Parasitology **47**(4):421-424.
- Kasai, H. (2002). Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. Free Radical Biology & Medicine **33**(4): 450-456.
- Kawahara, N.; Tanaka, T.; Yokomizo, A.; Nanri, H.; Ono, M.; Wada, M.; Kohno, K.; Takenaka, K.; Sugimachi, K. and Kuwano, M. (1996). Enhanced coexpression of thioredoxin and high mobility group protein 1 genes in human hepatocellular carcinoma and the possible association with decreased sensitivity to cisplatin. Cancer Research **56**(23): 5330-5333.
- Kelner, M. J. and Montoya, M. A. (2000). Structural organization of the human glutathione reductase gene: determination of correct cDNA sequence and identification of a mitochondrial leader sequence. Biochemical and Biophysical Research Communications **269**(2): 366-368.
- Kelly, B. S.; Antholine, W. E. and Griffith, O. W. (2002). *Escherichia coli* gamma-glutamylcysteine synthetase. Two active site metal ions affect substrate and inhibitor binding. The Journal of Biological Chemistry **277**(1): 50-58.

- Kim, J.-H.; Dahms, H.-U.; Rhee, J.-S.; Lee, Y.-M.; Lee, J.; Han, K.-N. and Lee, J.-S. (2010). Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes in cadmium-exposed river pufferfish (*Takifugu obscurus*). Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology :CBP **151**: 99-106.
- Kim, S. J., Park, E. H. and Lim, C. J. (2004). Stress-dependent regulation of the gene encoding gamma-glutamylcysteine synthetase from the fission yeast. Molecular Biology Reports **31**(1): 23-30.
- Kim, S.C.; Cho, M.K. and Kim,S.G. (2003). Cadmium-induced non-apoptotic cell death mediated by oxidative stress under the condition of sulfhydryl deficiency. Toxicology Letters **144**(3): p. 325-336.
- Kim, Y. C.; Masutani, H.; Yamaguchi, Y.; Itoh, K.; Yamamoto, M. and Yodoi, J. (2001). Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors. The Journal of Biological Chemistry **276**(21): 18399-18406.
- Kirlin, W. G.; Cai, J.; Thompson, S. A.; Diaz, D.; Kavanagh, T. J. and Jones, D. P. (1999). Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. Free Radical Biology & Medicine **27**(11-12): 1208-1218.
- Klaassen, C. D.; Liu, J. and Diwan, B. A. (2009). Metallothionein protection of cadmium toxicity. Toxicology and Applied Pharmacology **238**(3):215-220.
- Koharyova, M. and Kolarova, M. (2008). Oxidative stress and thioredoxin system. General Physiology and Biophysics **27**(2): 71-84.
- Krauth-Siegel, R. L. and Comini, M. A. (2008). Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. Biochimica et Biophysica Acta **1780**(11): 1236-1248.
- Krauth-Siegel, L. R.; Comini, M. A. and Schlecker, T. (2007). The trypanothione system. Sub-cellular Biochemistry **44**: 231-251.
- Krauth-Siegel, R. L.; Bauer, H. and Schirmer, R. H. (2005). Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. Angewandte Chemie **44**(5): 690-715.
- Krauth-Siegel, R. L. and Inhoff, O. (2003). Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule. Parasitology Research **90**: S77-S85.

Bibliografía

- Krol, A. (2002). Evolutionarily different RNA motifs and RNA-protein complexes to achieve selenoprotein synthesis. Biochimie **84**(8): 765-774.
- Kryukov, G. V.; Castellano, S.;, S. V.; Lobanov, A. V.; Zehtab, O.; Guigo, R. and Gladyshev, V. N. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. Science **300**(5624): 1439-1443.
- Krzywanski, D. M.; Dickinson, D. A.; Iles, K. E.; F. Wigley, A.; Franklin, C. C.; Liu, R. M.; Kavanagh, T. J. and Forman, H. J. (2004). Variable regulation of glutamate cysteine ligase subunit proteins affects glutathione biosynthesis in response to oxidative stress. Archives of Biochemistry and Biophysics **423**(1): 116-125.
- Kumagai, Y. and Sumi, D. (2007). Arsenic: signal transduction, transcription factor, and biotransformation involved in cellular response and toxicity. Annual Review of Pharmacology and Toxicology **47**: 243-262.
- Kuriyan, J.; Krishna, T. S.; Wong, L.; Guenther, B.; Pahler, A.; Williams, C. H. Jr. and Model, P. (1991). Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes. Nature **352**(6331):172-174.
- Lacey, B. M.; Eckenroth, B. E.; Flemer, S. and Hondal, R. J. (2008). Selenium in thioredoxin reductase: a mechanistic perspective. Biochemistry **47**(48): 12810-12821.
- Lacey, B. M. and Hondal, R. J. (2006). Characterization of mitochondrial thioredoxin reductase from *C. elegans*. Biochemical and Biophysical Research Communications **346**(3): 629-636.
- Laurent, T. C.; Moore, E. C. and Reichard, P. (1964). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from *Escherichia Coli* B. The Journal of Biological Chemistry **239**: 3436-3444.
- Leach, MD.; Stead, D. A.; Argo, E.; MacCallum, D. M.; and Brown, J. P. (2011). Molecular and proteomic analyses highlight the importance of ubiquitination for the stress resistance, metabolic adaptation, morphogenetic regulation and virulence of *Candida albicans*. Molecular Microbiology **79**: 1574-1593.
- Lee, J. R.; Lee, S. S.; Jang, H. H.; Lee, Y. M.; Park, J. H.; Park, S. C.; Moon, J. C.; Park, S. K.; Kim, S. Y.; Lee, S. Y.; Chae, H. B.; Jung, Y. J.; Kim, W. Y.; Shin, M. R.; Cheong, G. W.; Kim, M. G.; Kang, K. R.; Lee, K. O.; Yun, D. J. and Lee, S. Y. (2009). Heat-shock dependent oligomeric status alters the function of a plant-specific thioredoxin-like protein, AtTDX. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**: 5978-5983.

- Lee, K-W.; Raisuddin, S.; Rhee, J-S.; Hwang, D-S.; Yu, I.T.; Lee, Y-M.; Park, H. G. and Lee, J-S. (2008). Expression of glutathione S-transferase (GST) genes in the marine copepod *Tigriopus japonicus* exposed to trace metals. Aquatic toxicology **89**: 158-166.
- Lengqvist, J.; Svensson, R.; Evergren, E.; Morgenstern, R. and Griffiths, W. J. (2004). Observation of an intact noncovalent homotrimer of detergent-solubilized rat microsomal glutathione transferase-1 by electrospray mass spectrometry. The Journal of Biological Chemistry **279**(14): 13311-13316.
- Leonard, S. S.; Harris, G. K. and Shi, X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. Free Radical Biology & Medicine **37**(12): 1921-1942.
- Li, Y.; Dankher, O. P.; Carreira, L.; Smith, A. P. and Meagher, R. B. (2006). The shoot-specific expression of gamma-glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of thiol-peptides to roots conferring tolerance to mercury and arsenic. Plant Physiology **141**(1):288-298.
- Li, Y.; Dhankher, O. P.; Carreira, L.; Balish, R. S. and Meagher, R. B. (2005). Arsenic and mercury tolerance and cadmium sensitivity in *Arabidopsis* plants expressing bacterial gamma-glutamylcysteine synthetase. Environmental Toxicology and Chemistry **24**: 1376-1386.
- Li, Y.; Hugenholtz, J.; Abee, T. and Molenaar, D. (2003). Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. Applied and Environmental Microbiology **69**(10): 5739-5745.
- Liang, G.; Du, G. and Chen, J. (2008). Enhanced glutathione production by using low-pH stress coupled with cysteine addition in the treatment of high cell density culture of *Candida utilis*. Letters in Applied Microbiology **46**(5):507-512.
- Liebau, E.; Bergmann, B.; Campbell, A. M.; Teesdale-Spittle, P.; Brophy, P. M.; Lüersen, K. and Walter, R. D. (2002). The glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*. Molecular and Biochemical Parasitology **124**(1-2):85-90.
- Lin, X.; Kaul, S.; Rounsley, S.; Shea, T. P.; Benito, M. I.; Town, C. D.; Fujii, C. Y.; Mason, T.; Bowman, C. L.; Barnstead, M.; Feldblyum, T. V.; Buell, C. R.; Ketchum, K. A.; Lee, J.; Ronning, C. M.; Koo, H. L.; Moffat, K. S.; Cronin, L. A.; Shen, M.; Pai, G.; Van Aken, S.; Umayam, L.; Tallon, L. J.; Gill, J. E.; Adams, M. D.; Carrera, A. J.; Creasy, T. H.; Goodman, H. M.; Somerville, C. R.; Copenhaver, G. P.; Preuss, D.; Nierman, W. C.; White, O.; Eisen, J. A.; Salzberg, S. L.; Fraser, C. M. and Venter, J. C. (1999). Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. Nature **402**(6763): 761-768.

Bibliografía

- Limon-Pacheco, J. and Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. Mutation Research **674**(1-2): 137-147.
- Liochev, S. I. (1999). The mechanisms of "fenton-like reactions" and their importance for biological systems. *Metal Ions in Biological Systems*. Siegel. New York: 1-39.
- Liu, J.; Qu, W. and Kadiiska, M. B. (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. Toxicology and Applied Pharmacology **238**(3):209-214
- Liu, R. M.; Nebert, D. W. and Shertzer, H. G. (1993). Menadione toxicity in two mouse liver established cell lines having striking genetic differences in quinone reductase activity and glutathione concentrations. Toxicology and Applied Pharmacology **122**(1):101-107.
- Lobanov, A. V.; Fomenko, D. E.; Zhang, Y.; Sengupta, A.; Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2007). Evolutionary dynamics of eukaryotic selenoproteomes: large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life. Genome Biology **8**: R198.
- Loftus, B.; Anderson, I.; Davies, R.; Alsmark, U. C.; Samuelson, J.; Amedeo, P.; Roncaglia, P.; Berriman, M.; Hirt R. P.; Mann, B. J.; Nozaki, T.; Suh, B.; Pop, M.; Duchene, M.; Ackers, J.; Tannich, E.; Leippe, M.; Hofer, M.; Bruchhaus, I.; Willhoeft, U.; Bhattacharya, A.; Chillingworth, T.; Churcher, C.; Hance, Z.; Harris, B.; Harris, D.; Jagels, K.; Moule, S.; Mungall, K.; Ormond, D.; Squares, R.; Whitehead, S.; Quail, M. A.; Rabinowitsch, E.; Norbertczak, H.; Price, C.; Wang, Z.; Guillén, N.; Gilchrist, C.; Stroup, S. E.; Bhattacharya, S.; Lohia, A.; Foster, P. G.; Sicheritz-Ponten, T.; Weber, C.; Singh, U.; Mukherjee, C.; El-Sayed, N. M.; Petri, W. A. Jr.; Clark, C. G.; Embley, T. M.; Barrell, B.; Fraser, C. M.; Hall, N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. Nature **433**(7028):865-868.
- Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. Molecular Aspects of Medicine **30**(1-2): 42-59.
- Lu, J. and Holmgren, A. (2009). Selenoproteins. The Journal of Biological Chemistry **284**(2): 723-727.
- Lueder, D. V. and Phillips, M. A. (1996). Characterization of *Trypanosoma brucei* gamma-glutamyl-cysteine synthetase, an essential enzyme in the biosynthesis of trypanothione (diglutathionylspermidine). The Journal of Biological Chemistry **271**(29): 17485-17490.
- Maher, P. (2005). The effects of stress and aging on glutathione metabolism. Ageing Research Reviews **4**(2):288-314.

- Mannervik, B.; Alin, P.; Guthenberg, C.; Jensson, H.; Tahir, M. K.; Warholm, M. and Jornvall, H. (1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **82**(21): 7202-7206.
- Manta, B.; Comini, M.; Madeiros, A.; Hugo, M.; Trujillo, M. and Radi, R. (2013). Trypanothione: A unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. Biochimica et Biophysica Acta **1830**: 3199-3216.
- Marchetti, C. (2003). Molecular targets of lead in brain neurotoxicity. Neurotoxicity Research **5**(3): 221-236.
- Marchionatti, A. M.; Picotto, G.; Narvaez, C. J.; Welsh, J. and Tolosa de Talamoni, N. G. (2009). Anti-proliferative action of menadione and 1,25(OH)2D3 on breast cancer cells. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **113**(3-5):227-232.
- Margis, R.; Dunand, C.; Teixeira, F. K. and Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. The FEBS Journal **275**(15):3959-3970.
- Martin, G. W. 3rd; Harney, J. W. and Berry, M. J. (1996). Selenocysteine incorporation in eukaryotes: insights into mechanism and efficiency from sequence, structure, and spacing proximity studies of the type 1 deiodinase SECIS element. RNA **2**(2): 171-182.
- Martin, J. L. (1995). Thioredoxin--a fold for all reasons. Structure **3**(3): 245-250.
- Mary, C.; Faraut, F.; Deniau, M.; Dereure, J.; Aoun, K.; Ranque, S. and Piarroux, R. (2010). Frequency of drug resistance gene amplification in clinical leishmania strains. International Journal of Microbiology pii: 819060.
- Matthews, J. M. and Sunde, M. (2002). Zinc fingers-folds for many occasions. IUBMB Life **54**: 351-355.
- Matthews, J. R.; Wakasugi, N.; Virelizier, J. L.; Yodoi, J. and Hay, R. T. (1992). Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. Nucleic Acids Research **20**(15): 3821-3830.
- Mathew, J.; Cattam, A. R.; Hall, A. G.; Hines, J. E.; Nelson, R.; Eastham, E. and Burt, A. D. (1992 b). Glutathione S-transferases in neonatal liver disease. Journal of Clinical Pathology **45**(8): 679-683.

Bibliografía

- Mauzeroll, J. and Bard, A. J. (2004). Scanning electrochemical microscopy of menadione-glutathione conjugate export from yeast cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(21):7862-7867.
- May, M.J. and Leaver, C. J. (1994). *Arabidopsis thaliana* gamma-glutamylcysteine synthetase is structurally unrelated to mammalian, yeast, and Escherichia coli homologs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(21):10059-10063.
- Maya, J.D.; Rodríguez, A.; Pino, L.; Pabón, A.; Ferreira, J.; Pavani, M.; Repetto, Y. and Morello, A. (2004). Effects of buthionine sulfoximine nifurtimox and benznidazole upon trypanothione and metallothionein proteins in *Trypanosoma cruzi*. Biological Research **37**(1):61-69.
- McAmis, W. C.; Schaeffer, R. C. Jr.; Baynes, J. W. and Wolf, M. B. (2003). Menadione causes endothelial barrier failure by a direct effect on intracellular thiols, independent of reactive oxidant production. Biochimica et Biophysica Acta **1641**(1):43-53.
- McCarthy, S.; Somayajulu, M.; Sikorska, M.; Borowy-Borowski, H. and Pandey, S. (2004). Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble Coenzyme Q10. Toxicology and Applied Pharmacology **201**(1): 21-31.
- McGoldrick, S.; O'Sullivan, S. M. and Sheehan, D. (2005). Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. FEMS Microbiology Letters **242**(1): 1-12.
- McGonigle, B.; Keeler, S. J.; Lau, S. M.; Koeppe, M. K. and O'Keefe, D. P. (2000). A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. Plant Physiology **124**(3): 1105-1120.
- Mehta, R.; Templeton, D. M. and O'Brien, J. P (2006). Mitochondrial involvement in genetically determined transition metal toxicity II. Copper toxicity. Chemico-Biological Interactions **163**(1-2): 77-85.
- Meister, A. (1988). On the discovery of glutathione. Trends in Biochemical Sciences **13**(5): 185-188.
- Meister, A. and Anderson, M. E. (1983). Glutathione. Annual Review of Biochemistry **52**: 711-760.
- Mendoza-Cózatl, D.; Loza-Tavera, H.; Hernández-Navarro, A. and Moreno-Sánchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. FEMS Microbiology Reviews **29**(4):653-671.
- Messens, J. and Silver, S. (2006). Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. Journal of Molecular Biology **362**(1):1-17

- Mera, N.; Ohmori, S.; Itahashi, K.; Kiuchi, M.; Igarashi, T.; Rikihisa, T. and Kitada, M. (1994). Immunochemical evidence for the occurrence of Mu class glutathione S-transferase in human fetal livers. Journal of Biochemistry **116**(2): 315-320.
- Meyer, D. J.; Coles, B.; Pemble, S. E.; Gilmore, K. S.; Fraser, G. M. and Ketterer, B. (1991). Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. The Biochemical Journal **274** (Pt 2): 409-414.
- Miao, W.; Xiong, J.; Bowen, J.; Wang, W.; Liu, Y.; Braguinets, O.; Grigull, J.; Pearlman, R. E.; Orias, E. and Gorovsky, M. A. (2009). Microarray analyses of gene expression during the *Tetrahymena thermophila* life cycle. PLoS One 4(2): e4429.
- Miao, W.; Yu, T.; Orias, E.; Wan, M. and Fu, C. (2006). Identification of differentially expressed genes in *Tetrahymena thermophila* in response to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by suppression subtractive hybridization. Environmental Microbiology **8**(6): 1122-1129.
- Min, K. S.; Morishita, F.; Tetsuchikawahara, N. and Onosaka, S. (2005). Induction of hepatic and renal metallothionein synthesis by ferric nitrilotriacetate in mice: the role of MT as an antioxidant. Toxicology and Applied Pharmacology **204**(1):9-17
- Minami, Y.; Kohama, T.; Sekimoto, Y. J.; Akasaka, K. and Matsubara, H. (2003). Isolation and characterization of glutathione reductase from *Physarum polycephalum* and stage-specific expression of the enzyme in life-cycle stages with different oxidation-reduction levels. The Journal of Eukaryotic Microbiology **50**(5): 317-23.
- Mitsopoulos, P. and Suntres, Z. E. (2010). Cytotoxicity and gene array analysis of alveolar epithelial A549 cells exposed to paraquat. Chemico-biological Interactions **188**(3):427-436.
- Mockett, R. J.; Sohal, R. S. and Orr, W. C. (1999). Overexpression of glutathione reductase extends survival in transgenic *Drosophila melanogaster* under hyperoxia but not normoxia. FASEB Journal **13**(13): 1733-1742.
- Mohammadi-Bardbori, A. and Ghazi-Khansari, M. (2008). Alternative electron acceptors: Proposed mechanism of paraquat mitochondrial toxicity. Environmental Toxicology and Pharmacology **26**(1):1-5
- Montrichard, F.; Le Guen, F.; Laval-Martin, D. L. and Davioud-Charvet, E. (1999). Evidence for the co-existence of glutathione reductase and trypanothione reductase in the non-trypanosomatid Euglenozoa: *Euglena gracilis* Z. FEBS letters **442**(1): 29-33.
- Morán, J. M.; Ortiz-Ortiz, M. A.; Ruiz-Mesa, L. M. and Fuentes, J. M. (2010). Nitric oxide in paraquat-mediated toxicity: A review. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. **24**:402- 409.

Bibliografía

- Morel, F.; Rauch, C.; Petit, E.; Piton, A.; Theret, N.; Coles, B. and Guillouzo, A. (2004). Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. The Journal of Biological Chemistry **279**(16): 16246-16253.
- Morel, F.; Rauch, C.; Coles, B.; Le Ferrec, E. and Guillouzo, A. (2002). The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter. Pharmacogenetics **12**(4): 277-286.
- Morel, Y. and Barouki, R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. The Biochemical Journal **342** Pt 3: 481-496.
- Morrison, H. G.; McArthur, A. G.; Gillin, F. D.; Aley, S. B.; Adam, R. D.; Olsen, G. J.; Best, A. A.; Cande, W. Z.; Chen, F.; Cipriano, M. J.; Davids, B. J.; Dawson, S. C.; Elmendorf, H. G.; Hehl, A. B.; Holder, M. E.; Huse, S. M.; Kim, U. U.; Lasek-Nesselquist, E.; Manning, G.; Nigam, A.; Nixon, J. E.; Palm, D.; Passamaneck, N. E.; Prabhu, A.; Reich, C. I.; Reiner, D. S.; Samuelson, J.; Svard, S. G. & Sogin M. L. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. Science **317**(5846):1921-1926.
- Muglia, C. I.; Grasso, D. H. and Aguilar, O. M. (2007). *Rhizobium tropici* response to acidity involves activation of glutathione synthesis. Microbiology **153**(Pt 4):1286-1296.
- Mukhopadhyay, R.; Dey, S.; Xu, N.; Gage, D.; Lightbody, J.; Ouellette, M. and Rosen, B. P. (1996). Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(19): 10383-1087.
- Mulcahy, R. T. and Gipp, J. J. (1995). Identification of a putative antioxidant response element in the 5'-flanking region of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. Biochemical and Biophysical Research Communications **209**(1): 227-233.
- Muller, S. (2004). Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Molecular Microbiology **53**(5): 1291-1305.
- Muller, S.; Liebau, E.; Walter, R. D. and Krauth-Siegel, R. L. (2003). Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. Trends in Parasitology **19**(7):320-328.
- Muller, S.; Gilberger, T. W.; Farber, P. M.; Becker, K.; Schirmer, R. H. and Walter, R. D. (1996). Recombinant putative glutathione reductase of *Plasmodium falciparum* exhibits thioredoxin reductase activity. Molecular and Biochemical Parasitology **80**(2): 215-219.

- Mustacich, D. and Powis, G. (2000). Thioredoxin reductase. The Biochemical Journal **346** Pt 1: 1-8.
- Mutoh, N.; Kawabata, M. and Kitajima, S. (2005). Effects of four oxidants, menadione, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide, on fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Journal of Biochemistry **138**(6):797-804.
- Mutoh, N.; Nakagawa, C. W. and Hayashi, Y. (1995). Molecular cloning and nucleotide sequencing of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Journal of Biochemistry **117**(2):283-288.
- Nakagawa, I.; Suzuki, M.; Imura, N. and Naganuma, A. (1998). Involvement of oxidative stress in paraquat-induced metallothionein synthesis under glutathione depletion. Free Radical Biology & Medicine **24**(9):1390-1395.
- Nakagawa, I.; Suzuki, M.; Imura, N. and Naganuma, A. (1997). Enhancement of paraquat toxicity by glutathione depletion in mice in vivo and in vitro. The Journal of Toxicological Sciences **20**(5):557-564
- Nakagawa, I.; Suzuki, M.; Imura, N. and Naganuma, A. (1995). Enhancement of paraquat toxicity by glutathione depletion in mice in vivo and in vitro. The Journal of Toxicological Sciences **20**(5): 557-564.
- Nargund, A. M.; Avery, S. V. and Houghton, J. E. (2008). Cadmium induces a heterogeneous and caspase-dependent apoptotic response in *Saccharomyces cerevisiae*. Apoptosis **13**(6): 811-821.
- Nebert, D. W. and Vasiliou, V. (2004). Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. Human genomics **1**(6): 460-464
- Nebert, D. W. and Dieter, M. Z. (2000). The evolution of drug metabolism. Pharmacology **61**(3):124-135.
- Newairy, A. A.; El-Sharaky, A. S.; Badreldeen, M. M.; Eweda, S. M. and Sheweita, S. A. (2007). The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. Toxicology **242**(1-3): 23-30.
- Ngu, T. T.; Lee, J. A.; Pinter, T. B. J. and Stillman, M. J. (2010a). Arsenic-metalation of triple-domain human metallothioneins: Support for the evolutionary advantage and interdomain metalation of multiple-metal-binding domains. Journal of Inorganic Biochemistry **104**: 232-244.
- Ngu, T. T.; Dryden, M. D. M. and Stillman, M. J. (2010b). Arsenic transfer between metallothionein proteins at physiological pH. Biochemical and Biophysical Research Communications **401**: 69-74.

Bibliografía

- Nie, W.; Wei, G.; Du, G.; Li, Y. and Chen J. (2005). Enhanced intracellular glutathione synthesis and excretion capability of *Candida utilis* by using a low pH-stress strategy. Letters in Applied Microbiology **40**(5):378-384.
- Nielsen, A. E.; Bohr, A. and Penkowa, M. (2007). The balance between life and death of cells: roles of metallothioneins. Biomark Insights. **7**: 99-111.
- Nishimoto, M.; Sakaue, M. and Hara, S. (2006). Short-interfering RNA-mediated silencing of thioredoxin reductase 1 alters the sensitivity of HeLa cells toward cadmium. Biological & Pharmaceutical Bulletin **29**(3): 543-546.
- Nordberg, J. and Arner, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biology & Medicine **31**(11): 1287-1312.
- Notredame, C.; Higgins, D. G. and Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. Journal of Molecular Biology **302**(1): 205-217.
- Novoselov, S. V. and Gladyshev, V. N. (2003). Non-animal origin of animal thioredoxin reductases: implications for selenocysteine evolution and evolution of protein function through carboxy-terminal extensions. Protein Science **12**: 372-378.
- Oakley, A. J. (2005). Glutathione transferases: new functions. Current Opinion in Structural Biology **15**(6): 716-723.
- Ochi, T. (1996). Menadione causes increases in the level of glutathione and in the activity of gamma-glutamylcysteine synthetase in cultured Chinese hamster V79 cells. Toxicology **112**(1):45-55.
- Ondarza, R. N.; Hurtado, G.; Tamayo, E.; Iturbe, A. and Hernandez, E. (2006). *Naegleria fowleri*: a free-living highly pathogenic amoeba contains trypanothione/trypanothione reductase and glutathione/glutathione reductase systems. Experimental Parasitology **114**(3): 141-146.
- Ondarza, R. N.; Iturbe, A.; Hernández, E. and Hurtado, G. (2003). Low-molecular-mass thiol compounds from a free-living highly pathogenic amoeba, *Naegleria fowleri*. Biotechnology and Applied Biochemistry **37**(Pt 2): 195-204.
- Ondarza R.N.; Tamayo, E. M.; Hurtado, G.; Hernández, E. and Iturbe, A. (1997). Isolation and purification of glutathionyl-spermidine and trypanothione from *Entamoeba histolytica*. Archives of Medical Research **28** Spec No:73-75.
- Overbaugh, J. M.; Lau, E. P.; Marino, V. A. and Fall, R. (1988). Purification and preliminary characterization of a monomeric glutathione S-transferase from *Tetrahymena thermophila*. Archives of Biochemistry and Biophysics **261**(2): 227-234.

- Oza S. L.; Shaw M.P.; Wyllie, S. and Fairlamb, A. H. (2005). Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. Molecular and Biochemical Parasitology **139**(1):107-116.
- Oza, S. L.; Ariyanayagam, M. R.; Aitcheson, N. and Fairlamb, A. H. (2003). Properties of trypanothione synthetase from *Trypanosoma brucei*. Molecular and Biochemical Parasitology **131**(1): 25-33.
- Oza, S. L.; Tetaud, E.; Ariyanayagam, M. R.; Warnon, S. S. and Fairlamb, A. H. (2002a). A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. The Journal of Biological Chemistry **277**(39): 35853-35861.
- Oza, S. L.; Ariyanayagam, M. R. and Fairlamb A. H.(2002b). Characterization of recombinant glutathionylspermidine synthetase/amidase from *Crithidia fasciculata*. The Biochemical Journal **364**(Pt 3): 679-686.
- Páez-Espino, D.; Tamames, J.; de Lorenzo, V. and Cánovas, D. (2009). Microbial responses to environmental arsenic. Biometals **22**(1):117-130
- Paget, T.; Maroulis, S.; Mitchell, A.; Edwards, M. R.; Jarroll, E. L. and Lloyd, D. (2004). Menadione kills trophozoites and cysts of *Giardia intestinalis*. Microbiology **150**(Pt 5):1231-1236.
- Pai, C. H.; Chiang, B. Y.; Ko, T. P.; Chou, C. C.; Chong, C. M.; Yen, F. J.; Chen, S.; Coward, J. K.; Wang, A. H. and Lin, C.H. (2006). Dual binding sites for translocation catalysis by *Escherichia coli* glutathionylspermidine synthetase. The EMBO Journal **25**(24): 5970-5982.
- Papp, L.V.; Lu, J.; Holmgren, A. and Khanna, K. K. (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. Antioxidants & Redox Signaling **9**(7): 775-806.
- Pasternak, M.; Lim, B.; Wirtz, M.; Hell, R.; Cobbett, C. S. and Meyer, A. J. (2008). Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology **53**(6):999-1012.
- Pastore, A.; Federici, G.; Bertini, E. and Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. Clinica Chimica Acta **333**(1): 19-39.
- Peacock, C. S. (2007). The practical implications of comparative kinetoplastid genomics. SEB Experimental Biology Series **58**: 25-45.
- Pearson, W. R. (2005). Phylogenies of glutathione transferase families. Methods in Enzymology **401**: 186-204.
- Perbandt, M.; Burmeister, C.; Walter, R. D.; Betzel, C. and Liebau, E. (2004). Native and inhibited structure of a Mu class-related glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*. The Journal of Biological Chemistry **279**(2): 1336-1342.

Bibliografía

- Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W. and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research **30**(9): e36.
- Pocsi, I.; Miskei, M.; Karányi, Z.; Emri, T.; Ayoubi, P.; Pusztahelyi, T.; Balla, G. and Prade, R. A. (2005). Comparison of gene expression signatures of diamide, H₂O₂ and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures--linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology. BMC Genomics **6**:182.
- Pocsi, I.; Prade, R. A. and Penninckx, M. J. (2004). Glutathione, altruistic metabolite in fungi. Advances in Microbial Physiology **49**: 1-76.
- Poot, M.; Teubert, H.; Rabinovitch, P. S. and Kavanagh, T. J. (1995). De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. Journal of Cellular Physiology **163**(3): p. 555-560.
- Powis, G. and Montfort, W. R. (2001). Properties and biological activities of thioredoxins. Annual Review of Pharmacology and Toxicology **41**: 261-295.
- Pourahmad, J. and O'Brien, P. J. (2000). A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺. Toxicology **143**(3): p. 263-273.
- Prabhu, K. S.; Reddy, P. V.; Jones, E. C.; Liken, A. D. and Reddy, C. C. (2004). Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. Archives of Biochemistry and Biophysics **424**(1): 72-80.
- Prabhu, K. S.; Reddy, P. V.; Gumprich, E.; Hildenbrandt, G. R.; Scholz, R. W.; Sordillo, L. M. and Reddy, C. C. (2001). Microsomal glutathione S-transferase A1-1 with glutathione peroxidase activity from sheep liver: molecular cloning, expression and characterization. The Biochemical Journal **360**(Pt 2): 345-354.
- Prasad, B. D.; Goel, S. and Krishna, P. (2010). In silico identification of carboxylate clamp type tetratricopeptide repeat proteins in *Arabidopsis* and rice as putative co-chaperones of Hsp90/Hsp70. PloSONE **5**(9):212761. Doi:10.1371/journal.pone.0012761.
- Prieto-Alamo, M. J.; Jurado, J.; Gallardo-Madueno, R.; Monje-Casas, F.; Holmgren, A. and Pueyo, C. (2000). Transcriptional regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress. The Journal of Biological Chemistry **275**(18): 13398-13405.

- Rahman, I.; Bel, A.; Mulier, B.; Lawson, M. F.; Harrison, D. J.; Macnee, W. and Smith, C. A. (1996). Transcriptional regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications **229**(3): 832-837.
- Rana, S. V. (2008). Metals and apoptosis: recent developments. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology **22**(4): 262-284.
- Ranson, H.; Collins, F. and Hemingway, J. (1998). The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within the *Anopheles gambiae* class I glutathione S-transferase family. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(24): 14284-14289.
- Raza, H.; Robin, M. A.; Fang, J. K. and Avadhani, N. G. (2002). Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. The Biochemical Journal **366**(Pt 1): 45-55.
- Razinger, J.; Drinovec, L. and Zrimec, A. (2010). Real-time visualization of oxidative stress in a floating macrophyte *Lemna minor* L. exposed to cadmium, copper, menadione, and AAPH. Environmental Toxicology **25**(6): 573-580.
- Ren, J.; Privratsky, J. R.; Yang, X.; Dong, F. and Carlson, E. C. (2008). Metallothionein alleviates glutathione depletion-induced oxidative cardiomyopathy in murine hearts. Critical Care Medicine **36**(7): 2106-2116.
- Riccillo, P. M.; Muglia, C. I.; De Bruijn, F. J.; Roe, A. J.; Booth, I. R. and Aguilar, M. (2000). Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici* including acid tolerance. Journal of Bacteriology **182**: 1748-1753.
- Rico, D.; Martín-González, A.; Díaz, S.; de Lucas, P. and Gutiérrez, J. C. (2009). Heavy metals generate reactive oxygen species in terrestrial and aquatic ciliated protozoa. Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP **49**(1): 90-96
- Rife, C. L.; Pharris, R. E.; Newcomer, M. E. and Armstrong, R. N. (2002). Crystal structure of a genomically encoded fosfomycin resistance protein (FosA) at 1.19 Å resolution by MAD phasing off the L-III edge of TI(+). Journal of the American Chemical Society **124**(37): 11001-11003.
- Robinson, A.; Huttley, G. A.; Booth, H. S. and Board, P. G. (2004). Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. The Biochemical Journal **379**(Pt 3): 541-552.

Bibliografía

- Rodríguez-Martín, D.; Díaz, S.; Martín-González, A. y Gutiérrez, J. C. (2013). Resistencia diferencial de *Tetrahymena thermophila* a especies químicas inorgánicas de arsénico. XXIV Congreso de Microbiología (SEM). pp. 344. Barcelona.
- Rosen, B. P. (2002). Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS letters* **529**(1):86-92
- Rouhier, N.; Koh, C. S.; Gelhaye, E.; Corbier, C.; Favier, F.; Didierjean, C. and Jacquot, J. P. (2008). Redox based anti-oxidant systems in plants: biochemical and structural analyses. *Biochimica et Biophysica Acta* **1780**(11): 1249-1260.
- Rueggsegger, A.; Schmutz, D. and Brunold, C. (1990). Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum* L. *Plant Physiology* **93**(4): 1579-1584.
- Saitoh, M.; Nishitoh, H.; Fujii, M.; Takeda, K.; Tobiume, K.; Sawada, Y.; Kawabata, M.; Miyazono, K. and Ichijo, H. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *The EMBO Journal* **17**(9): 2596-2606.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Col Spring Harbor. New York. Laboratory Press.
- Sánchez-Pérez, G.; Mira, A.; Nyirö, G.; Pasic, L. and Rodriguez-Valera, F. (2008). Adapting to environmental changes using specialized paralogs. *Trends in Genetics* **24**:154-158.
- Sánchez-Puerta, M. V.; Lippmeier, J. C.; Apt, K. E. and Delwiche, C. F. (2007). Plastid genes in a non-photosynthetic dinoflagellate. *Protist* **158**: 105-117.
- Sandrini, J. Z.; Laurino, J.; Hatanaka, T. and Monserrat, J. M. (2006). cDNA cloning and expression analysis of the catalytic subunit of glutamate cysteine ligase gene in an annelid polychaete after cadmium exposure: a potential tool for pollution biomonitoring. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP* **143**(4): 410-415.
- Sato, I.; Shimizu, M.; Hoshino, T. and Takaya, N. (2009). The Glutathione System of *Aspergillus nidulans* Involves a Fungus-specific Glutathione S-Transferase. *The Journal of Biological Chemistry* **284**(12): 8042-8053.
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**(7): 995-1014.
- Schäfer, H. J.; Haag-Kerwer, A. and Rausch, T. (1998). cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator *Brassica juncea* L.: evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial gamma-glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Molecular Biology* **37**(1):87-97.

- Scherz-Shouval, R. and Elazar, Z. (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. Trends in Cell Biology **17**(9): 422-427.
- Schnekenburger, M.; Morceau, F.; Duvoix, A.; Delhalle, S.; Trentesaux, C.; Dicato, M. and Diederich, M. (2003). Expression of glutathione S-transferase P1-1 in differentiating K562: role of GATA-1. Biochemical and Biophysical Research Communications **311**(4): 815-821.
- Sebastia, J.; Cristòfol, R.; Martín, M.; Rodríguez-Farré, E. and Sanfeliu, C. (2003). Evaluation of fluorescent dyes for measuring intracellular glutathione content in primary cultures of human neurons and neuroblastoma SH-SY5Y. Cytometry A **51**(1): 16-25
- Seelig, G. F.; Simonsen, R. P. and Meister, A. (1984). Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits. The Journal of Biological Chemistry **259**(15): 9345-9347.
- Seo, J. S.; Lee, K. W.; Rhee, J. S.; Hwang, V.; Lee, Y. M.; Park, H. G.; Ahn, I. Y. and Lee, J. S. (2006). Environmental stressors (salinity, heavy metals, H₂O₂) modulate expression of glutathione reductase (GR) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. Aquatic Toxicology **80**(3): 281-289.
- Sharma, S.K. and Banyal, H. S. (2009). Gamma-glutamylcysteine synthetase from *Plasmodium berghei*. Parasitology International **58**(2): 145-153.
- Shaw, J.P. and Chou, I. N. (1986). Elevation of intracellular glutathione content associated with mitogenic stimulation of quiescent fibroblasts. Journal of Cellular Physiology **129**(2): p. 193-198.
- Sheehan, D.; Meade, G.; Foley, V. M. and Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. The Biochemical Journal **360**(Pt 1): 1-16.
- Shelly, C. and Lu, M. D. (2009). Regulation of glutathione synthesis. Molecular Aspects of Medicine **30**: 42-59.
- Shi, H.; Shi, X. and Liu, K. J. (2004). Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. Molecular and Cellular Biochemistry **255**(1-2): 67-78
- Shimizu, M.; Hochadel, J. F.; Fulmer, B. A. and Walkes, M. P. (1998). Effect of glutathione depletion and metallothionein gene expression on arsenic-induced cytotoxicity and c-myc expression in vitro. Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology **45**: 204-211.

Bibliografía

- Shimizu, M.; Hochadel, J. F.; Fulmer, B. A.; Waalkes, M. P. (1998). Effect of glutathione depletion and metallothionein gene expression on arsenic-induced cytotoxicity and c-myc expression in vitro. Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology **45** :204-211
- Shin, YH.; Park, E-H.; Fuchs, J. A. and Lim, C-J. (2002). Characterization, expression and regulation of a third gene encoding glutathione S-transferase from the fission yeast. Biochimica et Biophysica Acta **1577**: 164-170.
- Shrimali, R. K.; Lobanov, A. V.; Xu, X. M.; Rao, M.; Carlson, B. A.; Mahadeo, D. C.; Parent, C. A.; Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L. (2005). Selenocysteine tRNA identification in the model organisms *Dictyostelium discoideum* and *Tetrahymena thermophila*. Biochemical and Biophysical Research Communications **329**(1): 147-151.
- Smirnova, G. V.; Muzyka, N. G.; Glukhovchenko, M. N. and Oktyabrsky, O. N. (2000). Effects of menadione and hydrogen peroxide on glutathione status in growing *Escherichia coli*. Free Radical Biology & Medicine **28**(7):1009-10016.
- Smith, K.; Nadeau, K.; Bradley, M.; Walsh, C. and Fairlamb, A. H. (1992). Purification of glutathionylspermidine and trypanothione synthetases from *Crithidia fasciculata*. Protein Science **1**(7): 874-883.
- Sogin, M. L. (1991). Early evolution and the origin of eukaryotes. Current Opinion in Genetics & Development **1**: 457-463.
- Soltaninassab, S. R.; Sekhar, K. R.; Meredith, M. J. and Freeman, M. L. (2000). Multi-faceted regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase. Journal of Cellular Physiology **182**(2): 163-170.
- Song, J. Y. and Roe, J. H. (2008). The role and regulation of Trx1, a cytosolic thioredoxin in *Schizosaccharomyces pombe*. The Journal of Microbiology **46**(4): 408-414.
- Stadtman, E. R. (2006). Protein oxidation and aging. Free Radical Research **40**(12): 1250-1258.
- Stadtman, E. R. (1998). Free radical-mediated modification of protein. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants: Pathological and physiological significance. P. P. T. Ozben (Ed). Nueva York: 51-143.
- Steinbrenner, H. and Sies, H. (2009). Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. Biochimica et Biophysica Acta **1790**(11):1478-1485.
- Stohs, S. J. and Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radical Biology & Medicine **18**(2): 321-336.

- Stoll, V. S.; Simpson, S. J.; Krauth-Siegel, R. L.; Walsh, C. T. and Pai, E. F. (1997). Glutathione reductase turned into trypanothione reductase: structural analysis of an engineered change in substrate specificity. Biochemistry **36**(21): 6437-6447.
- Stolz, J. F.; Basu, P.; Santini, J. M. and Oremland, R. S. (2006). Arsenic and selenium in microbial metabolism." Annual Review of Microbiology **60**:107-130.
- Stover, N. A.; Krieger, C. J.; Binkley, G.; Dong, Q.; Fisk, D. G.; Nash, R.; Sethuraman, A.; Weng, S. and Cherry, J. M. (2006). Tetrahymena Genome Database (TGD): a new genomic resource for *Tetrahymena thermophila* research." Nucleic Acids Research **34**(Database issue): D500-3.
- Stoytcheva, Z. R. and Berry, M. J. (2009). Transcriptional regulation of mammalian selenoprotein expression. Biochimica et Biophysica Acta **1790**(11): 1429-1440.
- Strange, R. C.; Jones, P. W. and Fryer, A. A. (2000). Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. Toxicology Letters **112**-113: 357-363.
- Sun, Q. A.; Kirnarsky, L.; Sherman, S. and Gladyshev, V. N. (2001). Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(7): 3673-3678.
- Suntres, Z. E. (2002). Role of antioxidants in paraquat toxicity. Toxicology **180**(1): 65-77.
- Tabor, H. and Tabor, C. W. (1975). Isolation, characterization, and turnover of glutathionylspermidine from *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry **250**(7): 2648-2654.
- Takada, Y. and Matsuoka, T. (2008). Relationship between two tandemly arranged and light-induced glutathione S-transferase genes from the ciliated protozoa *Blepharisma japonicum*. Microbiological Research **163**(5): 512-522.
- Takada, Y.; Uda, K.; Kawamura, K. and Matsuoka, T. (2004). Molecular cloning and characterization of a novel glutathione S-transferase gene induced by light stimulation in the protozoan *Blepharisma japonicum*. FEMS Microbiology Letters **231**(2): 185-189.
- Takizawa, M.; Komori, K.; Tampo, Y. and Yonaha, M. (2007). Paraquat-induced oxidative stress and dysfunction of cellular redox systems including antioxidative defense enzymes glutathione peroxidase and thioredoxin reductase. Toxicology in Vitro **21**(3): 355-363.
- Tamayo, E. M.; Iturbe, A.; Hernández, E.; Hurtado, G.; de Lourdes Gutiérrez-X, M.; Rosales, J. L.; Woolery, M. and Ondarza, R. N. (2005). Trypanothione reductase from the human parasite *Entamoeba histolytica*: a new drug target. Biotechnology and Applied Biochemistry **41**(Pt 2):105-115.

Bibliografía

- Tamura, T. and Stadtman, T. C. (1996). A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(3): 1006-1011.
- Tauskela, J.S.; Hewitt, K.; Kang, L. P.; Comas, T.; Gendron, T.; Hakim, A.; Hogan, M.; Durkin, J. and Morley, P. (2000). Evaluation of glutathione-sensitive fluorescent dyes in cortical culture. Glia **30**(4): 329-341
- Tekman, B.; Ozdemir, H.; Senturk, M. and Ciftci, M. (2008). Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. Comparative Biochemistry and Physiology **148**(2): 117-121.
- Thévenod, F. (2009) Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? Toxicology and Applied Pharmacology **238**(3):221-223
- Thomas, D. J.; Waters, S. B. and Styblo, M. (2004). Elucidating the pathway for arsenic methylation. Toxicology and Applied Pharmacology **198**(3):319-326
- Thor, H.; Smith, M. T.; Hartzell, P.; Bellomo, G.; Jewell, S. A. and Orrenius, S. (1982). The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells. The Journal of Biological Chemistry **257**(20): 12419-12425.
- Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Analytical Biochemistry **27**(3): 502-522.
- Toledano, M. B.; Kumar, C.; Le Moan, N.; Spector, D. and Tacnet, F. (2007). The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. FEBS Letters **581**(19): 3598-3607.
- Tomita, M.; Okuyama, T.; Katsuyama, H. and Ishikawa, T. (2006). Paraquat-induced gene expression in rat kidney. Archives of Toxicology **80**(10):687-693.
- Toppo, S.; Vanin, S.; Bosello, V. and Tosatto, S. C. (2008). Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. Antioxidants & Redox Signaling **10**(9): 1501-1514.
- Toroser, D.; Yarian, C.S.; Orr, W.C. and Sohal, R. S. (2006). Mechanisms of gamma-glutamylcysteine ligase regulation. Biochimica et Biophysica Acta **1760**(2):233-244.

- Toung, Y. P.; Hsieh, T. S. and Tu, C. P. (1993). The glutathione S-transferase D genes. A divergently organized, intronless gene family in *Drosophila melanogaster*. The Journal of Biological Chemistry **268**(13): 9737-9746.
- Townsend, D. M. (2007). S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. Molecular Interventions **7**(6):313-324.
- Truong-Tran, A. Q.; Carter, J.; Ruffin, R. E. and Zalewski, P. D. (2001). The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. Biometals **14**(3-4): 315-330.
- Tsai, S. L.; Singh, S. and Chen, W. (2009). Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. Current Opinion in Biotechnology **20**(6):659-667
- Tu, C. P. and Akgul, B. (2005). *Drosophila* glutathione S-transferases. Methods in Enzymology **401**: 204-226.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. The Journal of Physiology **552**(Pt 2): 335-344.
- Udomsinprasert, R.; Pongjaroenkit, S.; Wongsantichon, J.; Oakley, A. J.; Prapanthadara, L. A.; Wilce, M. C. and Kettermann, A. J. (2005). Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme. The Biochemical Journal **388**(Pt 3): 763-771.
- Uziel, O.; Borovok, I.; Schreiber, R.; Cohen, G. and Aharonowitz, Y. (2004). Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* thioredoxin and thioredoxin reductase genes in response to oxygen and disulfide stress. Journal of Bacteriology **186**(2): 326-334.
- Valavanidis, A.; Vlahogianni, T.; Dassenakis, M. and Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety **64**(2): 178-189.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **39**(1): 44-84.
- Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions **160**(1): 1-40.
- Valko, M.; Morris, H. and Cronin, M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. Current Medicinal Chemistry **12**(10): 1161-1208.
- Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C. J. and Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Molecular and Cellular Biochemistry **266**(1-2): 37-56.

Bibliografía

- Vatamaniuk, O. K.; Bucher, E. A.; Ward, J.T. and Rea, P. A. (2001). A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. The Journal of Biological Chemistry **276**(24):20817-20820.
- Ventura-Lima, J.; Ramos, P. B.; Fattorini, D.; Regoli, F.; Ferraz, L.; de Carvalho, L. M. and Monserrat, J. M. (2011). Accumulation, biotransformation, and biochemical responses after exposure to arsenite and arsenate in the estuarine polychaete *Laeonereis acuta* (Nereididae). Environmental Science and Pollution Research International **8**(8):1270-1278
- Vergauwen, B.; De Vos, D. and Van Beeumen, J. J. (2006). Characterization of the bifunctional gamma-glutamate-cysteine ligase/glutathione synthetase (GshF) of *Pasteurella multocida*. The Journal of Biological Chemistry **281**(7): 4380-4394.
- Verstraeten, S. V.; Aimo, L. and Oteiza, P. I. (2008). Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. Archives of Toxicology **82**(11): 789-802.
- Vickers, T. J. and Fairlamb, A. H. (2004). Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid ribosomal elongation factor 1B. The Journal of Biological Chemistry **279**(26): 27246-27256.
- Vignais, P. V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. Cellular and Molecular Life Sciences **59**(9): 1428-1459.
- Vigo-Pelfrey, C. (1990). Membrane Lipid Oxidation. Florida. CRC Press
- Vuilleumier, S. and Pagni, M. (2002). The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. Applied Microbiology and Biotechnology **58**(2): 138-146.
- Waalkes, M. P.; Harvey, M. J. and Klaassen, C. D. (1984). Relative in vitro affinity of hepatic metallothionein for metals. Toxicology Letters **20**(1): 33-39.
- Wagner, U.; Edwards, R.; Dixon, D. P. and Mauch, F. (2002). Probing the diversity of the *Arabidopsis glutathione* S-transferase gene family. Plant Molecular Biology **49**(5): 515-532.
- Wang, X.; Stavchansky, S.; Zhao, B.; Bynum, J. A.; Kerwin, S. M. and Bowman, P. D. (2008). Cytoprotection of human endothelial cells from menadione cytotoxicity by caffeic acid phenethyl ester: the role of heme oxygenase-1. European Journal of Pharmacology **591**(1-3):28-35
- Watjen, W. and Beyersmann, D. (2004). Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. Biomaterials **17**(1): 65-78.
- Wawrzynska, A.; Wawrzynski, A.; Gaganidze, D.; Kopera, E.; Piatek, K.; Bal, W. and Sirko, A. (2005). Overexpression of genes involved in phytochelatin biosynthesis in *Escherichia coli*: effects on growth, cadmium accumulation and thiol level. Acta Biochimica Polonica **52**(1):109-16.

- Whittaker, C. A. and Hynes, R. O. (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. Molecular Biology of the Cell **13**(10): 3369-3387.
- Wikteliuss, E. and Stenberg, G. (2007). Novel class of glutathione transferases from cyanobacteria exhibit high catalytic activities towards naturally occurring isothiocyanates. The Biochemical Journal **406**(1): 115-123.
- Williams, C. H.; Arscott, L. D.; Muller, S.; Lennon, B. W.; Ludwig, M. L.; Wang, P. F.; Veine, D. M.; Becker, K. and Schirmer, R. H. (2000). Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. European Journal Biochemistry **267**(20): 6110-6117.
- Wongsantichon, J. and Kettermann, A. J. (2005). Alternative splicing of glutathione S-transferases. Methods in Enzymology **401**:100-116.
- Wu, J.; Qu, T.; Chen, S.; Zhao, Z. and An, L. (2009). Molecular cloning and characterization of a gamma-glutamylcysteine synthetase gene from *Chorispora bungeana*. Protoplasma **235**(1-4):27-36.
- Wu, A. L. and Moye-Rowley, W. S. (1994). GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. Molecular and Cellular Biology **14**(9): 5832-5839.
- Wyllie, S.; Oza, S. L.; Patterson, S.; Spinks, D.; Thompson, S. and Fairlamb, A. H. (2009). Dissecting the essentiality of the bifunctional trypanothione synthetase-amidase in *Trypanosoma brucei* using chemical and genetic methods. Molecular Microbiology **74**(3): 529-540.
- Wysocki R. and Tamás, M. J. (2010). How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. FEMS Microbiology Reviews **34**(6):925-951.
- Yamamoto, K. and Kawanishi, S. (1991). Site-specific DNA damage induced by hydrazine in the presence of manganese and copper ions. The role of hydroxyl radical and hydrogen atom. The Journal of Biological Chemistry **266**(3): 1509-1515.
- Yan, G.; Hua, Z.; Du, G. and Chen, J. (2006). Adaptive response of *Bacillus sp.* F26 to hydrogen peroxide and menadione. Current Microbiology **52**(3):238-242.
- Yang, H.; Kang, M.; Guo, X. and Xu, B. (2010) Cloning, structural features, and expression analysis of the gene encoding thioredoxin reductase 1 from *Apis cerana cerana*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology **156**(3): 229-236

Bibliografía

- Yeon, J. H. and Park, J. K. (2005). Cytotoxicity test based on electrochemical impedance measurement of HepG2 cultured in microfabricated cell chip. Analytical Biochemistry **341**(2):308-315.
- Yin, X. X.; Zhang, Y. Y.; Yang, J. and Zhu, Y. G. (2011). Rapid biotransformation of arsenic by a model protozoan *Tetrahymena pyriformis* GL-C. [corrected] Environmental Pollution **159**(4):837-840.
- Yu, Q.; Lu, C.; Li, B.; Fang, S.; Zuo, W.; Dai, F.; Zhang, Z. and Xiang, Z. (2008). Identification, genomic organization and expression pattern of glutathione S-transferase in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology **38**: 1158-1164.
- Zadzinski, R.; Fortuniak, A.; Bilinski, T.; Grey, M. and Bartosz, G. (1998). Menadione toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells: activation by conjugation with glutathione. Biochemistry and Molecular Biology International **44**(4):747-759.
- Zaroogian, G. and Jackim, E. (2000). In vivo metallothionein and glutathione status in an acute response to cadmium in *Mercenaria mercenaria* brown cells. Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP **127**(3):251-261
- Zhang, J.; Fu, R.-Y.; Hugenholtz, J.; Li, Y. and Chen, J. (2007). Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress. Applied and Environmental Microbiology **73**: 5268-5275.
- Zhao, F. J.; Ma, J. F.; Meharg, A. A. and McGrath, S. P. (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. New Phytologist **181**: 777-794
- Zhou, J.; Wang, W.-N.; Wang, A.-L.; He, W.-Y.; Zhou, Q.-T.; Liu, Y. and Xu, J. (2009). Glutathione S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and regulation under pH stress. Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP **150**: 224-230.
- Zhu, Y. L.; Pilon-Smits, E. A.; Tarun, A. S.; Weber, S. U.; Jouanin, L. and Terry, N. (1999). Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase. Plant Physiology **121**(4):1169-1178.
- Zimniak, P. (2007). Substrates and reaction mechanisms of glutathione transferases. En: Toxicology of Glutathione transferases. (Ed. Awasthi YC.). Taylor & Francis. CRC Press. pp. 71-101.

Introducción

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Resumen de resultados

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

Introducción

Objetivos

Materiales y
Métodos

Resultados

Discusión

Resumen de
resultados

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

Anexo I

Para facilitar la comprensión de las tablas sobre los análisis estadísticos en la determinación de glutatión y mortalidad celular, en este anexo se explican, a modo de ejemplo, los diferentes tipos de resultados que se pueden obtener. En primer lugar analizaremos la posibilidad de existencia de una interacción entre los dos factores que hemos utilizado en el estudio, los inhibidores de glutatión (BSO o NEM) y el productor de estrés (Cd^{2+} , As^{5+} , PQ, MD ó pH5).

Interacción:	NO (0,360)		
Efecto de BSO:	(0,364)		
Efecto de Cd^{2+}:	0-1,32: (0,763)	1,32-1,54: (0,708)	1,54-1,76: (0,539)

Como el valor p es 0,360, superior a 0,05 no existe interacción entre el Cd^{2+} y el BSO, es decir, el comportamiento del Cd^{2+} no afecta al comportamiento del BSO y viceversa.

Por el contrario, nos podemos encontrar casos en los que sí existe interacción entre los dos factores, el inductor de estrés (Cd^{2+}) y el inhibidor de GSH (BSO).

Interacción:	SÍ (0,000)		
Efecto de BSO:			
Cd^{2+} (0): (0,000)	Cd^{2+} (1,32): (0,001)	Cd^{2+} (1,54): (0,002)	Cd^{2+} (1,76): (0,000)
Efecto de Cd^{2+}:			
BSO (-)	0-1,32: (0,004)	1,32-1,54: (0,013)	1,54-1,76: (0,048)
BSO (+)	0-1,32: (0,001)	1,32-1,54: (0,090)	1,54-1,76: (0,539)

En este caso sí existe interacción, puesto que el valor p es inferior a 0,05. La existencia de interacción entre los dos factores considerados se traduce en que el Cd^{2+} se comporta de forma diferente en presencia o ausencia de BSO y viceversa.

Cuando no existe interacción los efectos de los dos factores se analizan conjuntamente en la totalidad de la muestra, como se muestra en la siguiente tabla:

Anexo I

Interacción:	NO (0,360)		
Efecto de BSO:	(0,364)		
Efecto de Cd²⁺:	0-1,32: (0,763)	1,32-1,54: (0,708)	1,54-1,76: (0,539)

El efecto del BSO no es significativamente estadístico.

Interacción:	NO (0,360)		
Efecto de BSO:	(0,364)		
Efecto de Cd²⁺:	0-1,32: (0,763)	1,32-1,54: (0,708)	1,54-1,76: (0,539)

Analizamos el efecto del cadmio en el salto que se produce entre una concentración y la siguiente. En este caso no hay diferencias significativas entre las concentraciones 0 μM y 1,32 μM de Cd²⁺ porque el valor p es 0,763, superior a 0,05. Lo mismo sucede entre las siguientes concentraciones.

Por el contrario, cuando existe interacción entre los dos factores o tratamientos celulares aplicados (inhibidor y agente tóxico), el análisis debe ser diferente. Los factores BSO y NEM solo tienen dos niveles de actuación, presencia o ausencia. Para analizar su efecto llevamos a cabo una comparación de medias de muestras independientes para cada uno de los niveles (concentraciones) del otro factor. Un ejemplo se muestra en la siguiente tabla:

Interacción:	Sí (0,000)		
Efecto de BSO:			
Cd²⁺(0): (0,000)	Cd ²⁺ (1,32): (0,001)	Cd ²⁺ (1,54): (0,002)	Cd ²⁺ (1,76): (0,000)
Efecto de Cd²⁺:			
BSO (-)	0-1,32: (0,004)	1,32-1,54: (0,013)	1,54-1,76: (0,048)
BSO (+)	0-1,32: (0,001)	1,32-1,54: (0,090)	1,54-1,76: (0,539)

Aquí analizamos el posible efecto del BSO para cada una de las diferentes concentraciones de Cd²⁺ ensayadas. Los valores obtenidos indican que en este caso, el BSO ejerce un efecto significativo en todas las concentraciones de Cd consideradas.

Los metales y agentes oxidantes tienen 4 niveles (tres concentraciones distintas y un control: ausencia del tóxico). Si se detecta interacción entre tóxico e inhibidor los resultados deben analizarse de manera independiente, por una parte los tratamientos realizados en ausencia de BSO o NEM y por otra aquellos que se han llevado a cabo en presencia de estos agentes.

Interacción:	Sí (0,000)		
Efecto de BSO:			
Cd²⁺(0): (0,000)	Cd ²⁺ (1,32): (0,001)	Cd ²⁺ (1,54): (0,002)	Cd ²⁺ (1,76): (0,000)
Efecto de Cd²⁺:			
BSO (-)	0-1,32: (0,004)	1,32-1,54: (0,013)	1,54-1,76: (0,048)
BSO (+)	0-1,32: (0,001)	1,32-1,54: (0,090)	1,54-1,76: (0,539)

En las muestras que no tienen BSO hay diferencias significativas entre todas las concentraciones diferentes de Cd^{2+} .

Interacción:	Sí (0,000)		
Efecto de BSO:			
Cd ²⁺ (0): (0,000)	Cd ²⁺ (1,32): (0,001)	Cd ²⁺ (1,54): (0,002)	Cd ²⁺ (1,76): (0,000)
Efecto de Cd ²⁺ :			
BSO (-)	0-1,32: (0,004)	1,32-1,54: (0,013)	1,54-1,76: (0,048)
BSO (+)	0-1,32: (0,001)	1,32-1,54: (0,090)	1,54-1,76: (0,539)

Sin embargo, en las muestras que sí han sido expuestas al BSO, el metal sólo tiene efecto significativo entre las dos primeras concentraciones (0 y 1,32 μM de Cd).

Anexo II

ATGGATTATATCAAAGCTTAGATTTATGCTATTTTAAATAAAATTCACAgtaaaatgaaaagattatttaggcgctttaacaaata
 M D Y I K A Q I Y A I L I K F T
 aaacaactaaaaatatcgcgaaattataaacataattttagCTTTACTTTTATTAAATATCTTCGTGATTAAATATTACCA
 L Y F Y L N I F V I Q I F T I
 TTATTTTATTTAAATTAGCTACTTTTAGTGCCAAGAATTTCTCACATGCCCGTAGATTATACGATTAGTTGGCTATTGTTTCACC
 I L F K L A T F S A K N F S H A R R L Y D Q L A I V S P
 TTTGTTTTTAGCTATGACTGCCTCATCTCCTATATTCAGAGGTAAACTAGCTGCTGTCGATACAAGATGGGATATTATCGCTGCT
 L F L A M T A S S P I F R G K L A A V D T R W D I I A A
 TCTGTTGATTGTAGAAGTCGTGAAGAAAGAGATCCTTAGTCATCAAAATACATTCCATAAAGCAGATATGATTCTATCTCATATT
 S V D C R S R E E R D P Q S S K Y I P K S R Y D S I S Y F
 TTATTAGTGATGAGAAAAGAAATCTTCCTCAATACAATGATTTAAAAATCCCTCTCAACGAAGAAATAATGAACTTCGCTCGTTA
 I S D E K R N L P Q Y N D L K F P L N E E I M N F A R Q
 AAAATCAAAGAAATGGGATTAGGATTAGAAAATGATGAAAATTACATCAGACACCTTGGTTTCTTATATATCAGAGATCCTCTC
 K S K E M G L G L E N D E N Y I R H L G F L Y I R D P L
 GTTCTTTTTGAAAAGAAAATAAATGTTGATAATGAAAAGAAACTCTCCATTTTGAAAATATTTAATCCACCAACTGGAATTCTG
 V L F E K K I N V D N E K E T L H F E N I Q S T N W N S V
 TTCGCTTTAAACCACCACCATCTATGGACTCAAACATTGGCTGGAGAAC**AGAATTCAGAACTATGGAATGCTAGATTACTAACGA**
 R L K P P P S M D S N I G W R T E F R T M E C Q I T N D
TGAGAACGCTGCTTTTCATGCTTTTATCTCACATCTTTGTCAGACTCTTCTACCAATCTGATAGTTTAAATTTCTACATCCCCATT
 E N A A F M L L S H I F V R L F Y Q S D S L N F Y I P I
 ACTAAGGTAGACATTAATTTCTAGCGTGCTAAATAAATGGATGCAATCACTACTTAAAAATCTTCTTCGGTACTAACATTCATG
 T K V D I N F Q R A K Q M D A I T T Q K F F F R T N I H D
 ACGATGGCGAGCCCATCATTGAAGAGCTCACTTTACATGAAATATTCTTTGGAAAATCTAATGTTTTCGATGGTCTTTATAAATA
 D G E P I I E E L T L H E I F F G K S N V F D G L Y K Y
 TGCCAGCTAGATCTGGGAAAGTATGTTGAAAGAAGTTTTTGGATAAAATTATAGCATTAAAGACACAGAATTTGAAAAAGTTTGG
 A S Q I W E S M L K E V F G Q N Y S I K D T E F E K V W
 AACTTCATTTCGTGAACGTACTTCAGGTGAAAAAGTCACTGTTGCTAGATGGATTTCGTAACCTTCGTTAACAACCATCCTGAATATT
 N F I R E R T S G E K V T V A R W I R N F V N N H P E Y Q
 AATAAGATAGTGAAATCACAAATTCATTTGCTTTTGATTTAATAGAAGCTATTACTTCCATCTCTGATGGCACACTTTAAGATGC
 Q D S E I T N S I A F D L I E A I T S I S D G T L Q D A
 AAACCTTTACAACCATCTTT**TGA**
 N F T T I F Stop

Figura 1A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGCL* (TTHERM_00250970). La secuencia aminoacídica inferida se muestra debajo según el código de una sola letra. El intrón se muestra en azul y en minúsculas. Las regiones sombreadas en amarillo indican la localización de los cebadores utilizados para la RT-PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGAATATCTTGAAGAATAACTTTAAATTGGCTTGC**CTATAGGAGCTGGGATCACT**GGTATAGTATCTGGTATCTATT**GGTATC**
 M N I L K N N F K L A C A I G A G I T G I V S G I Y W Y H
ATGGTGCTTTTCTGATATAGAGTTTAGAGATTCAAAGTATGGTCCTTATGATTTCGTCTACTATAAGAGAGTAGGAAGCTATTA
 G A F S D I E F R D S K Y G P Y D F V Y Y K R V G S Y Q
 AACTTTAGGTAGTGAATGGTCAAAGATGAGTAATGAAGTTCAAAAATAGTTTAGCACTGTACATTTTATTGGCATATACTACGAT
 T L G S E W S K M S N E V Q K Q F S T V H F I G I Y Y D
 AACCTGAACAGCTAAAAGATCCAAATCAAGCAAGAGCAGCTCTTGGTTTTGCTGTTGGAAACTGTGAAAAGGATAAGATTAAGG
 N P E Q L K D P N Q A R A A L G F A V G N C E K D K I K A
 CTTTCTTAGATAGTCACCCAAATTACAAATTTACTGAGCTTCTGAAAGTGCAAGTCATTCTACGAGCTTCCCCTTCAAATCTTA
 F L D S H P N Y K F T E L P E V Q S H S T S F P F K S Y
 TTTTTCATTATAAATAGTAAAAGATAAAATATATCCCAAAGtaagagactttgtatttgagaaaaaacttaaatcatattgttta
 F S F K I V K D K I Y P K
 atagagtcttacttatttttaggttttaaaataaaaaataaattttgatatccccattggaaataattcataaagctacttattat
 ttgattgaatatagtttagaaggtatatataataaatacttctactaatacaaatataatcaatcaaagactctataaattat
 atatagaatagaatagatcattattatatttttcataaactattgattagtataaacatattttataaatacatttattttgctt
 attttttttttgaattttatcattaaagtcttattattttataaaaaatctatttttaattagttttcaaactaactttgaaaaataa
 taaatggattgaaaaataatactgaatccttttcaataaataaatttagataaaaaagtagaatatatttgagatatttatta
 taaactatatttgtaaattaaagaaaatttaattttttatttttttaatttttaatttagatatgaaaatattatcaaaaaatggt
 aaaggtgtttatagtccttacttcttaattagatgaattttaacaatttaatacatatataaagacgattttccttgattgaaaa
 agaaatagaaattatagagttgttttaggagataaaaaaattttccttttaaaattattttatcttaaaatattacaatatttataat
 aaaatttgttttgaatatcttaaatatttttaaaactttgatattttaaaatgaaaatatttgaaagccttttttagtcttttctt
 ctaattagTATGAATTTAACAATTTAAAAATTGTAAAGCCTATTTCTTTTAGGTTTATCTTGAgtaaatagaaactatagagta
 Y E F N N L K I V K P I F F Q V Y L D
 gtttagggagatataaaattttatttttaacttttcttaaaagaagaaccattttatataataaaatttgctttaagaaaa
 atgcttaagataactaaaatatttttttaaaatagatttttcaatttaaaatatctttttttattttattttaaaattttctagaaactact
 ttgtaatcttcttttttttttctaaagaaatattaagcttaagattttgaataaaataaaataaagcgcaattttttgataattta
 gaggaataacaaaataattattttattctctcgaatagatattttaatttatcagaaatcattctctctatattttctgttattcgc
 ttttaaaatgaataataattattttatttaaaatatataataaatttaataaaaaacaatcaaaataatttaaatagCATGATAAT
 M I I
 CCTTGGTTACTGGAATCTAAGAGGCTACGCTTAACTTATTCGTCTCCTTCTAGAATATTTGTAAGTAGATTATAAGGAAAACTT
 L G Y W N L R G Y A Q P I R L L L E Y L Q V D Y K E K L
 TATAACTAAGATGGAGAAGAATGGTTAAATGTTGATAAATAATAACTTAAACTAATTTCCCTAACTTACCTTATATAATTGATG
 Y N Q D G E E W L N V D K Q Q L K T N F P N L P Y I I D G
 GAGATATTGTTGTAACAGAATCAAAGTTATTCCTATTTACTTGGCCAAGAAATTCAAAAATTATGAGCTTATTGGCTAAAATCC
 D I V V T E S K V I P I Y L A K K F K N Y E L I G Q N P
 TGATGGGTCTTTTAATTTGAATGAAATTACATTCCTTTAAATCTTAGAAATTTTGAAAGAACTCAGAGATTTCGTTATTGAATTCA
 D G S F N L N E I T F L Q I L E I L K E L R D S L L N S
 GCAAAAGTACCATCTTTCAAAGAAGAAAAAGATTAAATTTTCAATGAAAAATTCAACATTACTTTTGAGgtatttgaatacaatt
 A K V P S F K E E K D Q I F N E K F N I T F E
 tttttaatttactaaatatttaattattattataaacaatagAAAAATAAGAAACAACCTTGGAGAGAACAAATACCTGCTTGGAAA
 N L S F I D F K I K K Q L G E
 TCTTTCAATTTATAGATTTCTATTTTATGAAGTTTTGAAATTTTCTAATTCCTTTATCCAAACTTTCAATCTTTACCGACTAT
 N K Y L L G Y F Y E V L K F F Q F F Y P K L S I F T D Y
 ATTGATAGAATAGAAAATATTCCTCAAATAAAAACTATCTTGAAACAAAAGAAAACAAAATCTTTATTCTTGATAGAATGAAAA
 I D R I E N I P Q I K N Y L E T K E N K I F I L D R M K S
 GCTATTTTATTAT**TGA**
 Y F Y Y Stop

Figura 2A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTM3* (THERM_00516440). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Los intrones se muestra en azul y en minúsculas. Las regiones sombreadas en amarillo indican la localización de los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

Figura 3A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTM4* (TTHERM_00518470). La secuencia aminoacídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Los intrones se muestra en azul y en minúsculas. Las regiones sombreadas en amarillo muestran la localización de los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGATTACTCTTGGCTACTGGAATGTTAGAGGATTAGGATAGTCTATCCGTTTCTTACTTGCTTATTTGGGTGTAGAATATAATA
 M I T L G Y W N V R G L G Q S I R F L L A Y L G V E Y N S
 GTAAGGTTTATAGCACAGCAGAAGAATGGTTTGGTAAAGATAAAAATAAAGTTAGGTTTAGAATTTCCAAATATTCCTTATATTAT
 K V Y S T A E E W F G K D K N N L G L E F P N I P Y I I
 CGATGGGAATTTAAGCTTACTGAATCTTCAGCCATTCTATCTATTTACTCAGGAAATACAAAAGAGCTGATTTATTAGGTTTT
 D G E F K L T E S S A I P I Y L L R K Y K R A D L L G F
 TCTAATGATGGAAGCTACAGTGAGAGAGAAGTTAGAGTTGCTCAGCTTATTGGTGTATAAAAGATATCTATAAGAAACAATTC
 S N D G S Y S E R E V R V A Q L I G V I K D I Y K E T I P
 CAGTATGTTTCAGCCCTGATTTTCGATAAAATAAAAGATTAAAGCTTTTGCCTAAGGGTGAAGTTTACTTAAAAAAGTTGTAAGTTT
 V C F S P D F D K I K D Q A F A K G E V L L K K L V S F
 TCTTGAGATAAAAGAGTTTTTGTCTAGTACTTTGACTTATGCTGATTTTCTCTTATATGAAGTACTATGCTATTATAAGTATATT
 L G D K E F L L S T L T Y A D F L L Y E V L C Y Y K Y I
 TATCCTTAAGCTATAACACCTACACTAACGGCTTATATGAACAGATTTGAGAATTTACCAGGAATTAAATAGTACATAGCAAACC
 Y P Q A I T P T L T A Y M N R F E N L P G I K Q Y I A N P
 CAAGCATAAATCTCAAAGCTTTCCTTCTACATTCAAATCTACATGGTCAGGTCCTCAATGA
 S I N L K A F L P T F K S T W S G P Q Stop

Figura 4A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTM9* (THERM_00661620). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Las regiones sombreadas en amarillo

ATGCTGAAAAAATTAGATTACATTAGGGTATTGGAATATAAGAGGTTTAGGTTAGCTAAGCAGATATCTTCTTGAATACACTG
 M A E K N Q I T L G Y W N I R G L G Q L S R Y L L E Y T G
 GTCTTAAGTACAAGGAAAAGAGATATTAAGGCTTGAGGAATGGTTCTAAAAGGATAAGTAAGGATTAGGAATAGAATTTGCAAA
 L K Y K E K R Y Q K L E E W F Q K D K Q G L G I E F A N
 CTTACCTTATTTAATAGATGGAGATTTAAATTAACCGAAAGCCACGCAGTAAATCTGTACATTATAAGAAAGAGCGGCAAGAAT
 L P Y L I D G D L K L T E S H A V N L Y I I R K S G K N
 GAATTGCTAGGAATAATCTGATCGAGGAATCTAAAATTAGAGAGCTTATTGGATATTTAGAAGATTTTTTCAGATAAATATTAA
 E L L G T N L I E E S K I R E L I G Y L E D F F R Q I L T
 CTTTGTGCTTTAATCCTTAATTTAGTATCATTAAGTAACAAAAGTATAATGATGACTTTAGCCTAAGATTGCAAGATTGGAAAA
 L C F N P Q F S I I K Q Q K Y N D D F S L R L Q R L E N
 TCAGCTCACTAAAGACAACAGAAAATGGCTTAATGGTCAATCACTTAGCCTTCCTGATTTTATATTCTATGAAATTAGTTAATAC
 Q L T K D N R K W L N G Q S L S L P D F I F Y E I S Q Y
 ATTAAGGAATCTATCCCGAAGAATTAAAAAACTGCCAAAAATCTAAGCCTTCCAAGCCCGTTTGAAGAAATTGAGTAAATAT
 I K G I Y P E E F K K L P K I Q A F Q A R F E E I E Q I Q
 AAGACTATATGATGTCTGAAGAGTACATTTATGCTCCATTCTTAGCAGTTGGTCATGGAGCCTAATGGACTGGCTTAAAAATAAA
 D Y M M S E E Y I Y A P F L A V G H G A Q W T G L K Q K
 ATGA
 Stop

Figura 5A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTM15* (THERM_00463010). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una única letra. Las regiones sombreadas en amarillo muestran la localización de los cebadores utilizados para la PCR. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGACATCAAAATTAATTTTGGATATTGGAACGGTAGAGGAAGAGGTTAATAAATTAGGTTCTTACTTGAATATGTAGAGGCCG
 M T S K L I F G Y W N G R G R G Q Q I R F L L E Y V E A D
 ATTATGAAGAAAAGACTTATATTTTCTCTGAGCCTGAATAGGACGAGTGGTTTAAGAAGGATAAAAAAGCTTTAAACCATTCCTCC
 Y E E K T Y I F S E P E Q D E W F K K D K K A L K P F P
 AAACCTACCTTACATTATAGATGGTGATTTTTTAAAGTGAGCATGAT**GTGTAATCAAGTATATAG**TCAAGAAGCATCCTAAA
 N L P Y I I D G D F Y L S E H D V V I K Y I V K K H P K
 TATCAGGAATTAATTGGTATAGGCAAAGGACCAATGACGAATTTATTGTAGATTAGCTTGTCTGTATAAACGATATAAGAG
 Y H E L I G I G K G P N D E F I V D Q L V S V I N D I R A
 CAACTATTAAAGATCTATGCTTTAATCCTAAAGTCCAAGAAGTCAAAAAGGAAGTACTAGCAACTACTCACACAAAGTTCAATTA
 T I K D L C F N P K V Q E V K K E V L A T T H T K F N Q
 ACTAATCGAATTTAAAAAAACAAATACCTTCCTTCTCCATACTTAACAATAGCTGATTTTAAACTTATTGAAGTCCTTCTCTAC
 L I E F K K T N T F L L P Y L T I A D F K L I E V L L Y
 TATAAAGCTCTTGACGAGATTAATTCGATGCAAATTTAAATGTTTTCAATCCTTACATCTATCATTTCCATTCCCTGCCTAGAA
 Y K A L D A D Q F D A N L N V F N P Y I Y H F H S L P R I
 TTTCAGAATATTTAAAGACTGACAGGTACAAATCCAACACTGTATTTTCCCAATTCAAAAAGTAGCTTTACTGGGTATGAATT
 S E Y L K T D R Y K S N T V F F P I Q K S S F T G Y E F
 TATAGAAGAATTTAATAAATAGTTTGT**TGA**
 I E E F N K Q F V Stop

Figura 6A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTM17* (TTHERM_00077530). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una única letra. Las regiones sombreadas en ama-

ATGGGCTGTTAAATTCAACTGGTTAAGTAAATGATATTCAAGCAAAAAACAGTGCTAACTTAGTTTTAGGTTATTGGGGACTTC
 M G C Q N S T G Q V N D I Q A K N S A N L V L G Y W G L P
 CATTAAGAGGTCAACCTCTCAGATATATCTTAGAGCTTGCTAACTATCCTTACACAGAACTAAATACACTTTATCTCAAGCTAC
 L R G Q P L R Y I L E L A N Y P Y T E T K Y T L S Q A T
 TGATTGGTTTGGTAAAGATAAATAAGAACTAGAATTAGATTTCCCAAATCTTCCATATCTCATTGATGTTTCTCAATTACA
 D W F G K D K Q E L E L D F P N L P Y L I H G D F S I T
 GAGTCTTCTAATATT**GCAAACTATTTGATCCAGTTAAC**AAAATAATATTATCTTCAAGGAGAAGGCTAAGATAAATACAGAGTTG
 E S S N I A N Y L I Q L T K Q Y Y L Q G E G Q D K Y R V D
 ATAACATTAGAT**ATGTATGCGATGAAGTGGCAG**CTAAATATTTTCATCAACTCTCTAGAAGGAAGAAGAAAAGAAGAAATTAATT
 N I R Y V C D E L A A K I F S S T L Q K E E E K K N Q L
 AGACACTTAAATTTCTCTAAATTAATAGCTCTAAAGGTATTAGGAAGTACTTCAAGAAATTGACTTTAGCA
 D T Q I L P K I K Q L Q K V L G T Q T S F F K K L T L A
 GACATTTATGCTTACACAGCATTGGCCTATTTCAAAAAGACATACTCTAAGGAATATCAGCAATTCTCATCAGACTTCGATCCTT
 D I Y A Y T A L A Y F K K T Y S K E Y Q Q F S S D F D P F
 TTTTAAAGAGATTTGAAGAAATTCCTAGAATAAAAAATTATCATCAATCTTAAAGATATAAAAAGTTA**TGA**
 L K R F E E I P R I K N Y H Q S Q R Y K K L Stop

Figura 7A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTM27* (TTHERM_00895750). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una única letra. Las regiones sombreadas en amarillo muestran la localización de los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGGGCTGTTAAATTCACCTAGTTTAGTAAATGATATCCAAGCAAAAAATAATGATAACTTGGTTTATAGGTTATTGGGGACTTC
 M G C Q N S T S L V N D I Q A K N N D N L V L G Y W G L P
 CATTAAGAGGTCAACCTCTCAGATATATCTTAGAGCTTGCTAACTATCCTTACACAGAACTAAATACACTCTATCTCAAGCTAC
 L R G Q P L R Y I L E L A N Y P Y T E T K Y T L S Q A T
 TGATTGGTTTGGTAAAGATAAATAAGAACTAGAATTAGATTTCCTCAATCTCATTTCATGGTGATTCTCAATTACA
 D W F G K D K Q E L E L D F P N L P Y L I H G D F S I T
 GAATCTTCTAATATT**GCAAACTATTTGATCCAGTTAA**CAAATTAACAATATCTTCAAGGAGAAGGCTAAGATAAATACAGAGTAA
 E S S N I A N Y L I Q L T N Q Q Y L Q G E G Q D K Y R V N
 ATAACATTAGAT**ATGTATGCGATGAAGTGA**CACTAAAATATTTTCATCAACTCTCTAGAAGGAAGAAGAAAGAAGAAATTAATT
 N I R Y V C D E L T A K I F S S T L Q K E E E K K N Q L
 AGACACTTAAATCTTCTTAAATTCATAGCTATAAAAGGTATTAGGAAGTTAGACTTCATTCTTCAAGAAATTGACTTTAGCA
 D T Q I L P K I Q Q L Q K V L G S Q T S F F K K L T L A
 GACATTTATGCTTACACAGCATTGGCCTATTTCAAAAAGACATACTCTATGGAATATCAGCAATTCGCATCAGACTTTGATCCTT
 D I Y A Y T A L A Y F K K T Y S M E Y Q Q F A S D F D P F
 TTTTAAAGAGATTGAAGAAATTCCTAGAATAAAAAATTATCATCAATCTGAAAGATATAAAAAATTA**TGA**
 L K R F E E I P R I K N Y H Q S E R Y K K L Stop

Figura 8A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTM28* (THERM_00895760). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Las regiones sombreadas en amarillo muestran la localización de los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGGGTTGCTCAAATTCACCTGGTTAAGTAAACGATATCCAAGTAAAAATAAAGATAACTTAGTTTATAGGTTATTGGGGACTTC
 M G C S N S T G Q V N D I Q V K N K D N L V L G Y W G L P
 CATTAAGAGGTCAACCTCTCAGATATATCTTAGAGCTTGCTAACTATCCTTACACAGAACTAAATACACTCTATCTCAAGCTAC
 L R G Q P L R Y I L E L A N Y P Y T E T K Y T L S Q A T
 TGATTGGTTTGGTAAAGATAAATAAGAACTAGAATTAGATTTCCTCAATCTCATTTCATGGTGATTCTCAATTACA
 D W F G K D K Q E L E L D F P N L P Y L I H G D F S I T
 GAGTCTTCTAATATT**GCAAACTATTTGATCCAGTTAA**CAAATTAACAATATCTTCAAGGAGAAGGCTAAGATAAATACAGAGTAG
 E S S N I A N Y L I Q L T N Q Q Y L Q G E G Q D K Y R V D
 ATAACATTAGAT**ATGTATGCGATGAAGTGA**CACTAAAATATTTTCATCAACTCTCTAGAAGGAGGAAGAAAGAAGAAATCAATT
 N I R Y V C D E L T A K I F S S T L Q K E E E K K N Q L
 AGAAACTTAAATCTTCTTAAATTCATAGCTCTAAAAGGTATTAGGAAGTTAGACTTCATTCTTCAAGAAATTGACTTTAGCA
 E T Q I L P K I Q Q L Q K V L G S Q T S F F K K L T L A
 GACATTTATGCTTACACAGCATTGGCCTATTTCAAAAAGACATACTCTAAGGAATATCAGCAATTCGCATCAGACTTTGATCCTT
 D I Y A Y T A L A Y F K K T Y S K E Y Q Q F A S D F D P F
 TTTTAAAGAGATTGAAGAAATTCCTAGAATAAAAAATTATCATCAATCTGAAAGATATAAAAAATTA**TGA**
 L K R F E E I P R I K N Y H Q S E R Y K K L Stop

Figura 9A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTM29* (THERM_00895770). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una única letra. Las regiones sombreadas en amarillo muestran la localización de los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGGGCTGCTCTGGTTCTTCCGCTGTAAAGGATAAAGACTGTATTAAATGAAAAGATTGTATTAGGTTATTGGGCTGTACACTTAT
 M G C S G S S A V K D K D C I N E K I V L G Y W A V H L Q
 AAGGTCAACCTGCCAGATACGTCTTAGAATTAGCTGGCATTCCATATGAAGACAGATTATACACCATGTAAAATCGTGCTGACTG
 G Q P A R Y V L E L A G I P Y E D R L Y T M Q N R A D W
 GTTCGAAAAAGATAAAACAACTTTGGGTTTTGATTATCCTAACCTTCCTTATATTATTCATGGCGACTTCAAATTAAGTAAAGC
 F E K D K Q T L G F D Y P N L P Y I I H G D F K I T E S
 CAGAACGTTGTAAATTATGTCATCGAAGTAACCAACCAATAGAACTTCTAGGTGAAGGTAAGGATAAAATACAGAGTCGGTCACG
 Q N V V N Y V I E V T N Q Q K L L G E G K D K Y R V G H V
 TTAGATATGTCTGTTAAGAAATACTTGGCAAACCTTTTGGAGCAATTATGAAGGAAAATGCTGAAGAGAAAATAAATGCCATCCA
 R Y V C Q E I L G K L F G A I M K E N A E E K Q N A I Q
 AAACGACGTCCTCCCAAAGCCAGGCTTGTTTAAACCTACCTTGGATCCCAAATAAATCTGCAGTGAACCTCACTATTGCCGAT
 N D V L P K A R L V Q T Y L G S Q N K F C S E L T I A D
 ATCTATGCTTACGTCTTTTCTTCAACTTAAAAAGAAAGCTCCTGAAGCCTACGCCGAATTTGCTGCTCAAATCGACCCCTTAC
 I Y A Y V F F F N L K K K A P E A Y A E F A A Q I D P L L
 TTTAAAACTTCGAAAGCATCCCCAATATTAATAAATACTAAGAATCTGAACGTTTTGCTAAAATCAACAATTCGA
 Q N F E S I P N I K K Y Q E S E R F A K I N N Stop

Figura 10A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTM40* (TTHERM_00602860). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Las regiones sombreadas en amarillo indican la localización de los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGGGCTGCAATCAAAGTTCTAGTGAAAACACTATTATCTCTTCAAATGCAAGAAAGTAGTTGCTTTTAGGATATTGGAATATTC
 M G C N Q S S S E N T I I S S N A R K Q L L L G Y W N I P
 CTTTGAGAGCATAACCTATTAGGTATATTTTAGAATTGGCTTAATACCCATACAGTGAAAAGAAATATTCCTAAAAAGAGCCCA
 L R A Q P I R Y I L E L A Q Y P Y S E K K Y S Q K E A Q
 AGAATGGTTTGGTAATGATAAATAAATCTTGGATTGGAATTCCTAACCTTCCTTACATTTTTTCATGGTGATTATCATTTAACT
 E W F G N D K Q N L G L E F P N L P Y I F H G D Y H L T
 GAAGCTTCTAACATTGCTAATTATGTTTTAGAAATTACTTGCTAGTAATATCTTTTAGGTTGTGGAGATGACAAATTCAGAATTG
 E A S N I A N Y V L E I T C Q Q Y L L G C G D D K F R I G
 GAAACATAAGATATGTCTGTGATGGGTTGATCATTGATGTTTTCAAGACTTTAAAAATGACTCCTGAAGAAAAATAAAGCTCTT
 N I R Y V C D G L I I D V F K T L K M T P E E K Q K L L
 AGAAAAATAATATAATTCTGATCTATACTCATTAAGGAAGCACTTGGTGAAGAAAGACTTACTTTTTTGGAAAGACTGACTGTTGCA
 E N N I I P D L Y S L K E A L G E K T Y F F G R L T V A
 GATATTTATGCCTACTGCGCTTTTGTAACTTCAAGCTTTTCTCCCAAATGAGTACAAATAATTTGCTAGTTCATTTAATAACT
 D I Y A Y C A F V N F K L F F P N E Y K Q F A S S F N N L
 TGATAATAAACTTCGAAGCTATCCCTGAAATCTAAGCTTATCAAAAATCAGATAGATTCCTAAATTTTAATTAATGA
 I I N F E A I P E I Q A Y Q K S D R F P K F Q L Stop

Figura 11A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTM41* (TTHERM_00490870). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Las regiones sombreadas en amarillo muestran la localización de los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGGGTTGTGGTTCTAGTTCAATTTAAGTTGCTGAAGTACCTAACTGTAATAAGTAATTATTATTGGGATATTGGGATATTCCTC
 M G C G S S S I Q V A E V P N C N K Q L L L G Y W D I P L
 TAAGAGCTTAACCAATAAGATACCTTCTCGAATTAGGTCAC'TTTCCTTACACTGAAAAAGGTATGCATAGAAAGATGCTCAAGA
 R A Q P I R Y L L E L G H F P Y T E K R Y A Q K D A Q E
 ATGGTTTGGCAAAGATAAATAAAATCTTGGTTTAGAATTCCTTAACCTTCCTTATATCACTCATGGGGATTATCATTTAACCGAA
 W F G K D K Q N L G L E F P N L P Y I T H G D Y H L T E
 GCAGCTAATATTGCTAATTATGTCATAGAAATTACTTGCTAATAAAACCTATTAGGATGTGGAGATGATAAATACAGAATTGGAA
 A A N I A N Y V I E I T C Q Q N L L G C G D D K Y R I G N
 ATATTAGATATGTCTGCGATGGCTTGATTATTGATGTTTTCAAGACTTTAAAAATGACTGCTGAAGAAAAATAAAAGCTCTTAGA
 I R Y V C D G L I I D V F K T L K M T A E E K Q K L L E
 AAATAATATTATT**CCTGATCTCTACTCAT**TGAATGAAGCACTTGGTGAAAAAAGCTTACTTCTTCGGTAGATTAACTATTGCAGAT
 N N I I P D L Y S L N E A L G E K T Y F F G R L T I A D
 GTTTATGCCTACTGCGCATTTGTCAACTTCAAGTTATTCTTCCCAAATGAATATAAATAGTTTGCTAGCTCATTTGATCACCTAA
 V Y A Y C A F V N F K L F F P N E Y K Q F A S S F D H L I
 TAATCAATTTTGAAGCTATTCCCGAAATTTAAGCTTATCAAAAATCAGATAGATTCCCTAAATTTTAATTA**TGA**
 I N F E A I P E I Q A Y Q K S D R F P K F Q L Stop

Figura 12A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTM42* (THERM_00490880). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Las regiones sombreadas en amarillo muestran la localización de los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGGATAACAAAACCTTGTGCTTAAAAATAAGTAACTTTAGGATATTGGAACATCCCCTTAAGAGCTTAGCCAATTAGATATCTTC
 M D N K T C A Q K Q V T L G Y W N I P L R A Q P I R Y L L
 TTGAATTAGGTCATTACCCTTATGTAGAAAAAGTATACTTAATAAGACGCTTCAGAATGGTTTGGAAAAGACAAACAAAACCT
 E L G H Y P Y V E K K Y T Q Q D A S E W F G K D K Q K L
 TGGCTTGGAAATACCCCAACCTTCCTTATCTTATCTAAGGTGATTTTCATATAACTGAAGCTTCTAATATAGCTAATTATGTGATT
 G L E Y P N L P Y L I Q G D F H I T E A S N I A N Y V I
 GAAATTACTCATTAATAAAGACTTTTAGGATGTGGGGATAATAAATTTAGAGTTGGAAACATTAGATATGTCTGTGATGGATTGA
 E I T H Q Q R L L G C G D N K F R V G N I R Y V C D G L I
 TATATCGATGTCTTCAAACTTTAAAAATGACTCCTGAAGAAAAGCAAAACCTTTAGAAAACAACATCCTT**CCTGATCTCTACTC**
 I D V F K T L K M T P E E K Q K L L E N N I L P D L Y S
ATTGAAGGAGGCTCTTGGTGAAAAACCTATTCTTTGGAAATATAACTATTGCTGATGTTTATGCCTACTGCGCTTTAGTCAAC
 L K E A L G E K T Y F F G N I T I A D V Y A Y C A L V N
 TTCAAATTATTCTTCCCAAATGAATATTAATAATTTGCAAATCTTCTTTTGATCGTATTATTACAATTTGGAAGCCATTCTCTG
 F K L F F P N E Y Q K F A N S S F D R I I H N F E A I P E
 AAATTAAAGCTTACCAAAAATCAGATAGATTCCCTAAGTTTAAATTT**TGA**
 I K A Y Q K S D R F P K F Q F Stop

Figura 13A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTM43* (THERM_00490900). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Las regiones sombreadas en amarillo muestran la localización de los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGTCTAAATAATCTTAAGAAAATTAACAACTGATTAGTGCTAGGCTATTGGCCATTTCAGGAAGAAATATGCCAGTTATTT
 M S K Q S Q E N Q Q T D L V L G Y W P F A G R N M P V I F
 TTATGCTGGAAATACTAAATATCCCTTATTAAGTTAATATTTTTGACCAAACACATGGTTTGGTAAAGAAAAAGAAGACCTCAA
 M L E I L N I P Y Q V N I F D Q N T W F G K E K E D L N
 TTTAGATTTCCCAAATCTACCATTCCCTTATTGATAACTCTAATGGTATGAAGATTACTGAAATACATAACATCGTTAACTATATT
 L D F P N L P F L I D N S N G M K I T E I H N I V N Y I
 CTCTATAAATATGAGAAAGGAAGAAATTTGTAGGACAT**TCATCGCTCAAGTCCTTAC**ACCTAAAGTCGCAATAGAGTTAAGTTGT
 L Y K Y E K G R N L Q D I H R S S P Y T Q S R N R V K L S
 CAGCTGATCATTTCATCATATAATCCTATCGACGACTTCAAGATTGATGAAATCAGATTATTTTAAAC**GATGTCTTCACTCAAAT**
 A D H S S Y N P I D D F K I D E I R F I L N D V F T Q I
 ATCTTCTGCTACTGCTAAGTTCCCTAAGAAAACAGATAAAATACGCTTAAGATACCATAGTACCAAATGAATAAATTAATT
 S S A T A K F P Q E N Q I K Y A Q D T I V P K L N K L I
 AAATTTATAGAACAAAAAATTAAGCTACTACATCATATACTCAATACTTTGTTATGGGGTATTTAAGTGTGTAGACTGTTACT
 K F I E Q K N Q A T T S Y T Q Y F V M G Y L S V V D C Y F
 TCTACATAATATCTAAGTACTTCTAGAAGTATTTCCCTCACTTTATGATGATTACTCACATGTATTCGACTTGGTCCTTAATAG
 Y I I S K Y F Q K Y F P S L Y D D Y S H V F D L V L N S
 CTTTGAAATATCTCTGAAATAAAAAATACATCAATTCTGATAAATATCCAACCTCTAGGG**TGA**
 F E N I P E I K K Y I N S D K Y P T L G Stop

Figura 14A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTM46* (THERM_00794370). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Las regiones sombreadas en amarillo muestran la localización de los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGAGCAATTTAATTTTAAGCTATTGGAACCTAAGAGGTAGAACTGAGCCTATCAGAATGCTCTTAAATTATCTATAATTACCTT
 M S N L I L S Y W N L R G R T E P I R M L L N Y L Q L P Y
 ACACCTATAAGGGATACGATCTTTCTAGCTATAATTAGTGGAAGTAAGTTGACAAACCTGCTCTTTAGTCTGATTTCCCTAATTT
 T Y K G Y D L S S Y N Q W K Q V D K P A L Q S D F P N L
 ACCCTATCTTAAAGATGGAGACTATGTTTTAACAGAGTCAGATGCAATAGCTCAATACGTTTGTGTAAGGCTAACAGAGAAGAC
 P Y L K D G D Y V L T E S D A I A Q Y V C V K A N R E D
 ATGATTGGCACAACCATTTGAGGACAGAATCAATATTGCTAGAATCAGAGGGATTGTAAATGAAAATATATACTTGATTGGACAGC
 M I G T T I E D R I N I A R I R G I V N E N I Y L I G Q L
 TTGCTTATAGCCCTAAATACAAAGAAGAAATTAAGCAAACTTCTAAAGATTCTCAGTCCCTTTGGCTAATTAATAATATTTT
 A Y S P K Y K E E L K A N F Q R F S V P F G Q L N N Y L
 AAATAATAAGGAGTATATCAATAATGGTAAAATTTGCTATTATGACTTCTACCTTTA**TGAGCTTATGTTTCATCGCT**CATAAAATA
 N N K E Y I N N G K I C Y Y D F Y L Y E L M F I A H K I
 TTTAAAGAAGAAAATGTCTTTGATGTTTTCCAAATCTTCGTAGTCACTACTACAGAATCTAGAATTTACCTAAATATAAGACT
 F K E E N V F D V F P N L R S H Y Y R I Q N L P Q I Q D Y
 ATTTGAATTCGGATA**GATACAACAAATCATTGCTTATC**TACGGGCCAACTTCTGTATGGAATTCTGATTCAACTCTT**TGA**
 L N S D R Y N K S F V I Y G P T S V W N S D S T L Stop

Figura 15A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTM47* (THERM_00205200). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Las regiones sombreadas en amarillo localizan los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGGATATTACTGCTACTA**ACGAACCT**GTAAGATTCTACTGCTTTGTTACTTGTCTTACGCCATCAGGGTAAGAACCGCTTTAG
 M D I T A T N E P V R F Y C F V T C P Y A I R V R T A L E
AACTCCTCTAAGTACCATATGAATATAATGAAATTGATCTATTGGTAAATTAATAA**CTTACTCCTGAGTTCCTAAAAATAAATCC**
 L L Q V P Y E Y N E I D L L V N Q Q L T P E F L K I N P
 CCTCCATTAAGTACCAGTGATTATTAAACAAGCAAGGATAG**gtagattataaatattccttataaattaaatgtaattttattatttta**
 L H Q V P V I I N K Q G Q
ttagACTATATCAGAAAGCTTGGTCTGCTTAGAGTATCTCAATGATAAATACTAACCTGGCTTGTCTCCTTAAGACAGTTTCTAA
 T I S E S L V C L E Y L N D K Y Q P G L L P Q D S F Q
 AGAGCCCAATCAGAAATGGATCACATATTATAGTTCTATTGACGCAAAGAAATGGAGAATTTTAGGTGCTATTAGAAACAAAA
 R A Q I R K W I T Y Y S S I D A K K W R I L G A I R N K N
 ATAAAGAAGAAGCTTATCGTATTCTAAATGAAATTTAATAAAATTTAAATTTCTGTCTATCTAAATTGATTGGCAATTAGAGT
 K E E A Y R I L N E I Q Q N L K F L S S Q I D L P I R V
 TGAATAAAATTCAAAAACCTTCTGTTTGGTCTACTTTTGGGATGGGTGATATTGCTATTCTACCAGTTTTAGATTAAATGATT
 E Q N S K T F L F G S T F G M G D I A I L P V L D Q M I
 ATATTATTTGAAACTGCATTTGGAAAG**taattttatttttttaaaatgtttaatttttgtaaaataaatatctaactttttttatt**
 I L F E T A F G K
ttttaaggCATATTTTAAAGATAATTTGAATGGAAGAGATGTTGATGCACATAAGCACTTTATATTTGGTTTGAAATACCAA
 H I L K D N L N G K D V D A L K A L Y I W F E N T K
 ATAGTAACCTGCATACTAAAAGTCAACATACAAGCTTTAGAGTCTACCATAAAATCCTCTAATTGATGAACCTTAACTTAAGAAAT
 Q Q P A Y Q K S T Y K L Q S L P Q N P L I D E L N L R N
 AACTGGCAATTCGATAAATATTACATAAACTTTGCATAAAGAAAGTTCTTCCCTAGTGGTTAAATCCCAAAATTA**TGA**
 N W Q F D K Y Y I N F A Q R K F F P S G Q I P K L Stop

Figura 16A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTO1* (THERM_00924320). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Los intrones se muestran en azul y en minúsculas. Las regiones sombreadas en amarillo localizan los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGTCATAACCCACCTTAAATTATACGAAATATACTTTGCTCTTATGTACAAAGAGTGAGATTGCTTTGGAA**GCCTTGAAAC**
 M S Q P H L K L Y G N I L C P Y V Q R V R F A L E A L K L
TTTAATACGATTATGTAGAAATAGATTTGTTAGCTAAAAAGCATTATAAGAAGAATATCTTGCTATTAATCCCTTGGGATGTGT
 Q Y D Y V E I D L L A K K H L Q E E Y L A I N P L G C V
 CCCAACAAATTAACATTAATAACTCA**gtaaaataaattaataaatgttttaattttttctaatttttttattttaaaaacag**AATGTTT
 P T I N I N N S N V Y
 ATGAAAGTCTTGTCTTGCTAGAGTTCCTCGAAGAGTAATTTGGAAATGTTTTCCCAAAAGATACTATAAAAAGAGCTCAGCAGAG
 E S L V L L E F L E E Q F G N V F P K D T I K R A Q Q R
 AATATGGGCAAACTATTATGATTAAATGTGATTGGAAATATTGGGATGTATTCTAAGTCTACAAGAGCAAGGACGAAGAGGGC
 I W A N Y Y D Q N V I G N I W D V F Q V Y K S K D E E G
 TTAATAAAGTTGGCAATAAACTTGCAGAAGAAATCAGGTACTGGGTTAAGCAAACTAAATTATCAGAAAGAGTAAAGGCTAACC
 L K K L A N K L A E E I R Y W V K Q T K L S E R V K A N P
 CTAATAAATTTCTATGAAGGTGAATAACTTACCTATGTTGACTTTGCTGTCTGCTCCTCATAAGATACTTAGAAGATATTGTTTCG
 K T F Y E G E Q L T Y V D F A V V P H T R Y L E D I V R
 TGTCACATTCAACAAATAATTATTTGATTTGGTTGAAAATGATGATCTAATTAAAGATTTTAGAACCTACATTAACAACGTAACC
 V T F N K Q L F D L V E N D D L I K D F R T Y I N N V T
 TCTTCTGAAGCTTATAATAGAATAACCCATAAGCTTCCATCATTAACAGCCACGGAGAAACTCCCTCCTTGATAGCCTTAACCT
 S S E A Y N R I T H K L P S L P A H G E N S L L D S L N F
 TTAATCCCGAAACTTATGACTACAGTAAACTCGTAAGAGCTTATCTTTCCAAAGATTTGAATCC**TGA**
 T P E T Y D Y S K L V R A Y L S K R F E S Stop

Figura 17A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTO6* (THERM_00572020). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Los intrones se muestran en azul y en minúsculas. Las regiones sombreadas en amarillo localizan los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGAGTATTAAAACTTATCTTAGCTAAATTATGAAATATTTATGGATTGGGGTAGCTAACCTTCAAGGGCTGT**CATGACTGTTG**
 M S I K N L S Q L N Y E I F M D W G S Q P S R A V M T V V
TATATTTTCTCAAAAAACCTCATAAAATTAACGAAGTCAGAATTTTAAAAAAGTAGAATGTTAGTGAATAATATAAAAAAATAAA
 Y F L K I P H K I N E V R I L K K Q N V S E Q Y K K I N
 TCCTGATCAAAAAATTCCTTGCATCATTGATAACGAAAACCTTTTTTTTGAATGAATCTCATTCAATTATGAGATATTTCTGCTAA
 P D Q K I P C I I D N E N F F L N E S H S I M R Y F C Q
 CTATATGGTGATAATTAGCTTTACCTGATGATAATTTAAAAAAGAGAGCCTTAATTGATAGCTATCTAGACTGGCATCACTCAA
 L Y G D N Q L Y P D D N L K K R A L I D S Y L D W H H S N
 AACTCGCAAGATGCATAGAATGCTCTTTAAAAAGCTTTTTGAACCACAACCTTGGCATTAACTTCTATTAATATTGAAGAATT
 T R K M H R M L F K K L F E P Q L G I Q T S I N I E E L
 AGAATCAGATGTGTAAAAAGCTCTAGCTTTTATTGAAAATAACTATTTGAACCATAAAAAATAAATCTCTTTGGATTGATAAC
 E S D V Q K A L A F I E N N Y L N H K N K F F F G F D N
 TATACTTTAGCTGATATCAGCGCATATTGTGAACCTTTATTAATCAAAAGTAGTTAATTACAGCTTTTAACCATAACCTAACATTT
 Y T L A D I S A Y C E L Y Q S K V N Y S F Q P Y P N I L E
 TAGAATGGATGTCAAAAAATGTAACAAATAAATGAAATAAAATAAACTCATAAAGTGTATGATGAACCTGTAAATAAAAGAATCTA
 W M S K M Q Q I N E V I K Q T H K V Y D E L L N K R I Q
 AAAGTAATCATCGAAATTG**TGA**
 K Q S S K L Stop

Figura 18A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtG5T71* (THERM_00729240). La secuencia aminoácida inferida se muestra debajo según el código de una letra. Las regiones sombreadas en amarillo localizan los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGACAACAAAACCAAGCACTAACTTTATATTGAATGGCTTAGTTAGCCATCTAGAGCTATTGTAACCTTTTGCTTAATTGAAAC
 M T T K P S T K L Y I E W L S Q P S R A I V T F C L I E N
 ATATTCCTCATGAG**TTGGTAGAAGTTAGAATTAAA**AAGTTAGAAAACAGAACTCCAGAATATAAAAAAATGTTCCCCACTGCTAA
 I P H E L V E V R I K K L E N R T P E Y K K M F P T A K
 GTTGCCTGGAATGTCTGAAACTCTTGAAAACGGCGAATAATTTAATTTATTTGAAAGCCATGCAATCATGAGATACTTAGCAGAC
 L P G M S E T L E N G E Q F N L F E S H A I M R Y L A D
 AGATATAACAAATCTAATCTTTATCCAAGAGGAAATATTTAGCTAAAGGCTAAAGTTGATTCTTACTTAGATTGGCATCATACAA
 R Y N K S N L Y P R G N I Q L K A K V D S Y L D W H H T N
 ATACAAGAAAATGCGCTCCTTATCTTTTGTATCAATACTTCGCTCCTGTTTATAGGTATTAAGCCTTAATTTGATGTGAACACATT
 T R K C A P Y L F D Q Y F A P V L G I K P Q F D V N T L
 ATTTAAAGAAGTTGAAAGTGTTCAGGTTTATTGAGAGGGTTTGGTTAGATCAAGGAAAGAATAAATATATAGGTAATAACTAA
 F K E V E S V F R F I E R V W L D Q G K N K Y I G N N Q
 CAGTTAACAATAGCTGACTTATCATGCTATTCTGAGATTATTTAAATGAAATTTGATGATTATGATTTCAAAAACAAGACTCCTA
 Q L T I A D L S C Y S E I I Q M K F D D Y D F K N K T P I
 TTTTATATGAATGGATGTAGAGAATAGAAGCTCTTCCAGAAATATAAAAAACTCATCAAGTTTATTTAAGTTAGCTCCTTAAAT
 L Y E W M Q R I E A L P E I Q K T H Q V L F K L A P Q I
 TTCTAAGAACAAATAAAAAGCAAAATTA**TGA**
 S K N K Q K A K L Stop

Figura 19A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtG5T73* (THERM_00499540). La secuencia aminoácida inferida se muestra debajo según el código de una letra. Las regiones sombreadas en amarillo localizan los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGGCTGAAAGCTCAAAGAAAATTACTCTTTACAGTTATTTCCGCTCCTCAACTTCATGGAGAGTAAGAATAGCTCTTAATCTTA
 M A E S S K K I T L Y S Y F R S S T S W R V R I A L N L K
 AGAAAATAGACTACAACATCATTCCTATTAACCTTTTGAAGAGTGAATAAACTTCTGAAGAATATACTAAAATCAATCCTAATA
 K I D Y N I I P I N L L K S E Q T S E E Y T K I N P N Q
 GGtaattaatttaattttttatgagagtaattataattctaagaaatataaaacactattaggGAGTCCCTGCT**TAAAGTATGG**
 G V P A L K Y G
AGACGAGGTTATTATTGAAAGCTCTGCTATCTTAGAGTTTTTGAAGAAGTATTTCTGAGCACCCACTTCTTCTTAAGATGCA
 D E V I I E S S A I L E F L E E V F P E H P L L P Q D A
 GTTAAAGAGCTTAAATTAGAGGCTTTTGCCAAGTAATTAACACTGCCATCCACCCCTCTCTAAAATT**TGAGGGTGCTTAATAAGA**
 V K R A Q I R G F C Q V I N T A I H P L Q N L R V L N K I
TTGAAAAGGAATATAGCTAAGACAAGATTCAATGGCTCAAATTCTGGGTTACTAAGGGTTTGACAG**gtaattaattttaattcta**
 E K E Y S Q D K I Q W L K F W V T K G L T A
 ttataatgaatgagcggttcaataatttaaaaaatatataaagCAATTGAAGAATTATTAAAGAATTCTCATGGAAAATATTGCTT
 I E E L L K N S H G K Y C F
 TGGTGATGAAATAACACTTGCTGACTTATTCTTGGTACCTCAAGTTCAAGGAGTTGTAGATAGATTCCAATTTGATTTAACCCCT
 G D E I T L A D L F L V P Q V Q G V V D R F Q F D L T P
 TTCCCAATATTGCAGAAGTTTTAAAAAATTTAAAGGAAATTCCTGAGTTGCTTGCCTCACCCAGCAAGTAAGCTGACAATC
 F P N I A E V L K N L K E I P E F V A A S P S K Q A D N P
 CTGATAATCAAAAGATC**TGA**
 D N Q K I Stop

Figura 20A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTZ1* (THERM_00575360). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una única letra. Los intrones se muestra en azul y en minúsculas. Las regiones sombreadas en amarillo localizan los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGAGTGAATAAATAAATAATATATCCTTTATGGCAATTACCGTTCTTACCTTCTTGGCGAGTAAGATTAGCACTTGGTTTAA
 M S E N N Q N I I L Y G N Y R S S P S W R V R L A L G L K
 AAAAGATAGAATACAAATTAGTTCAATTGACCTTTTTAAAAATGAGTAAAAATCTGAAGTATACTTCAAGGTTAATCCAATTA
 K I E Y K L V S I D L F K N E Q K S E V Y F K V N P N Q
 AgtaaatattttttctcaaatattatatttaattttgaagtaatttatctataaagCGTATCCCTGCTCTTATATATGGAGATCA
 R I P A L I Y G D Q
 AACATTGATAGAAAGCACTGCAATAATCGAGTTCTTAGAAGAAAATTTTCTTAGTATCCTTTACTTCCCGAGGATAGAATTAAG
 T L I E S T A I I E F L E E N F P Q Y P L L P E D R I K
 AGAGCTTAGATTAGAGGCTTTTGCTAAGTCATAAA**CAGTGCTATTTCATCCCTAT**TAGAATTCAAATTTAATAGGAAAAATT**GAAA**
 R A Q I R G F C Q V I N S A I H P Y Q N S N L I G K I E K
AAGAAGGCAATATGAATAAGTTAGAATGGATTAAATTCTGGGTGACTAAGGGGTTGACAG**gtaaacaaataattctttttctata**
 E G N M N K L E W I K F W V T K G L T A
 atttttttaataaataatattcttatatttcagCTATAGAAGAACTTTTGAAGAAATATCATGGAAAATTTGCTTTGGTGATGA
 I E E L L K K Y H G K F C F G D D
 TATAACGATGGCAGATATTTTCTTAATCCCTTAAGTATCTGCAGTAGTAGAAAGATTTGGATTTCGATTTAACACCTTTTCTCTT
 I T M A D I F L I P Q V S A V V E R F G F D L T P F P L
 ATCTTAAGTGTGTAAATAACTTAAAGGATCTCCAGAATTTATTGCTGCTTCCCCTAGTAATTAACCAGATTATACTGAATAAA
 I L S V V N N L K D L P E F I A A S P S N Q P D Y T E Q K
 AAAAT**TGA**
 N Stop

Figura 21A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTZ2* (THERM_00575390). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una única letra. Los intrones se muestra en azul y en minúsculas. Las regiones sombreadas en amarillo localizan los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en rojo y verde respectivamente.

ATGTCAGAA**TTATAGATTTTAGGTCCTTTAG**GAAATATTCATATCAACATCGCATTGATTATTGCAGAA**TTAGCAGGTGTTCC****TT**
 M S E L Q I L G P L G N I H I N I A L I I A E L A G V P L
TGAAGCATGTAGTAGTTGAACACAAAGCAACTGGCAAAGAAATTCGTAAAGAAATATCCTCTAGGTTAATCCCTATTCTCAT
 K H V V V E H K E A T G K E F V K K Y P L G L I P I L I
 TACTCCTGATAGAGAGACTATTTTACTCCAGTTGCTATTTTAAATATATTGCAAGAGCAGGAAAATAATTATTAGGCTCTTCT
 T P D R E T I L T P V A I F K Y I A R A G K Q L L G S S
 CCTCTTGATGAGACTAAGATTGATCAATTTTGGATATTATTTTGGGTAATTTGCATAAACTTTATGAAGATATCACAACTAGTA
 P L D E T K I D Q F L D I I L G N L H K S Y E D I T T S I
 TCTATGGATACAGAGAATATGATGAAACCTCAGTTAAAAATGCCAAAAAGCTTTTTGAAAAGAATTTAAAGTTTATTAACGATGC
 Y G Y R E Y D E T S V K N A K K L F E K N L K F I N D A
 TTTAAAGATTGATACTTACCTAGTTGGCTAAAAGTTATCTATTGTCGATATAGCATTAGCTGCAGTCTTCATCGTACATTCAAA
 L K I D T Y L V G Q K L S I V D I A L A A V L H R T F K
 ATAGCCTTTGATGACAAATTCAGATCTGAAAATCCTCATAAGTTGTCACCTTAGATATTTTACGAGTATTCTGTTTTCTCTA
 I A F D D K F R S E N P H T V R H L R Y F S S I P V F S K
 AATACTTTGGCAGATTAACATTAGCTTCAGGTGACTGGGCTCCTGCTAAAAAGCTGCAGGTAACCTTTACTTAAATACTAACTAA
 Y F G R L T L A S G D W A P A K K A A V K A T Q I L T K
 AAAAAATATAAAACAG**TGA**
 K I Q K Q Stop

Figura 22A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTN1* (THERM_00041590). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Las regiones sombreadas en amarillo localizan los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGACCTACCAATTACTCGCCCCGCTGGTAACCTTCAGAGCTAACATGCTCCTCACCATCGCTGAATTAGTCGGTGTAAAGCTCG
 M T Y Q L L A P A G N F R A N M L L T I A E L V G V K L E
 AACTCGTTTACACTGAATACGCTGCCACCAAGACCCCCGAATTCAAGCAAAAGAACCCTTAGGTAAGGTTCCCGTCTTATTAC
 L V H T E Y A A T K T P E F K Q K N P L G K V P V L I T
 CCCCAGAGGTCCCGTCTACGAATCTAATGCCATCGCTAGACACCTCGCCAGAAGCTGCTGGTAAGCTCTACGGTGCTAACCAACAC
 P E G P V Y E S N A I A R H L A R T A G K L Y G A N Q H
 GAAGCTGCTTTGGTTGACTAATACTTAGATATGGCCGTTACTGAATTATTACCCTCTTTGACCACCACCTTTACGCTATTTTCG
 E A A L V D Q Y L D M A V T E L L P S L T T T L Y A I F G
 GTTTCAGCCTGCTGACAAGGAAGTCTCAAGGCTGCTAAATAAGAAACCTTCAGCGTCTTGAGAATCTTAAACGAAAGACTCAC
 F K P A D K E V L K A A K Q E T F S V L R I L N E R L T
 CCACCACAAGTACTTAGCTGGTGAACCTCACTATTGCTGATATCCAACCTCGCTACTTTCTTAAACCTCGCTTTTACAGGTTACC
 H H K Y L A G E N L T I A D I Q L A T F L N L A F R V T
 ATCTCTGGCGAACAAAAGAAGCCTATTGCTAAGGTTGTTGAATACCTCGTTAGAGTTGCTCAACTCCCCGAATTCACCAAGTATC
 I S G E Q K K P I A K V V E Y F V R V A Q L P E F T K Y H
 ACGGAAGACCCCACTTCGCCACCTCTGAATTCTAAACTGTTGCTGCCCCGCTGCTGAAGCTAAGGACAACAAGAAGAAGGAAGC
 G R P H F A T S E F Q T V A A P A A E A K D N K K K E A
 TGCCAAGGCTAAGGAAGCCCCCAAGCCCAAGGAAGCTCCCAAGAAGAAGGAAGAAAAGGTTGAAGAAGAAGAAAAGGAAGAACAA
 A K A K E A P K P K E A P K K K E E K V E E E E K E E Q
 CCGCTAGCGGCTGGAACCTTGTATGACTACAAGACCTCTACGTCAACGCCAAGAACAAGAAGCCATCTAAACTTAGTTG
 P A S G W N L Y D Y K T L Y V N A K N K E E A I Q N L V E
 AAAACTTCGACGCCAAGACCATGTGCATCTACCACTTACACTACCAAAAGTACACTGGTGATGGTCAAGTCCTCTATCTCTTCAA
 N F D A K T M C I Y H L H Y Q K Y T G D G Q V L Y L F N
 CAACATGAAGAACAATTTCTCTAAAGATGTGACCCGCTAGAAAGGTGCGTTTTCGGTACCTACTCTATCTACGGTGAAGAACC
 N M K N N F L Q R C D P A R K V A F G T Y S I Y G E E P
 AACCTCGAAATCTCTGGTGTCTGGTTGTTTCATGGGTGCCACCATTCCTCCTCAAATGAACGAAAATCCTTCTTTTGAATATCACG
 N L E I S G V W L F M G A T I P P Q M N E N P S F E Y H D
 ACCTCAAGCAATTAGATATACCAAGGCTGAAGACTTACAAATCCTCAGAAACTACTGGACCAACACC**TGA**GAAGAAGACACCTCCGT
 L K Q L D I T K A E D L Q I L R N Y W T N T E E D T S V
 TGTGATGGTCTTAGACTCAGATCTTTCGGTTCTTTCAAG**TGA**
 V D G L R L R S F G S F K Stop

Figura 23A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGSTN2* (THERM_00402120). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Las regiones sombreadas en amarillo localizan los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATG GACGTAGAAATTTAAATACGACTTTTTCGTCATTGGTGGTGGTTCTGGAGGTTTAGCAGCTGCTAAGGAAGCTGCTTCCTTTG
 M D V E F K Y D F F V I G G G S G G L A A A K E A A S F G
 GAGCAAGAGTAGCTGTGGCTGACTTTGTCAAGCCTTCTCCTGTTGGCACAAAATGGGGTTTAGGAGGTAataaataaatcaatta
 A R V A V A D F V K P S P V G T K W G L G G T
 tatgttttagcatatttaatatctcagctattttaagacaatagttgataaacttgagttttacataagccatagctaaaaatttat
 attaatattttattataggttaCTTGTGTTAATGTCGGTTGTATTCTTAAGAAGCTTATGCACTTTGCCGCTCATACGGTGAAAGT
 C V N V G C I P K K L M H F A A S Y G E S
 CATGAAGCTTAAAAGAATATGGGTTGGACTGAAATCAAGGAAAAAACAACATGAATGTAAACCTATGGTTGAAGGGGTTTAAG
 H E A Q K N M G W T E I K E K N K H E W Q P M V E R V Q A
 CTCATATCAAGAAATTGAATTGGGGTTACAAGGTTGAAGCTCGCTGAAAAGGAAGTCAAGTACTACAATAGCTTGGCTAGTATAGT
 H I K K L N W G Y K V E L A E K E V K Y Y N S L A S I V
 AGGCAAGAATACAATTGAAGtaataaacattaataaatatattgtttttgttttaaaatcggtttctctctctattttttttatttta
 G K N T I E
 tgtaagagatgctattttttatataaaagtataaagagggaaataatgtgttttattaatcattttacgtatttttttaataatcaattttt
 ttttaatatatttagCTTACTAACAGAAAGGGAGAAAAGGAATAAGTTACTGCTAAGTACATTTTGATTGCTGTTGGTGGTAGACCAA
 L T N R K G E K E Q V T A K Y I L I A V G G R P T
 CATTCTTAGATATTCTAATACTGAAAAGTTAGTCACTACTTCTGATGATATCTTTTCTATGTAAAACCTCTCGGAAAAACATT
 F L D I P N T E K L V I T S D D I F S M Q N P P G K T L
 AGTCGTTGGTCTTCTATATAGCCTTAGAATGTGCAGGTTTCTTAGCTGGTTTGGTTATGACGTTACTGTGCTAGGTTAGATCA
 V V G A S Y I A L E C A G F L A G F G Y D V T V M V R S
 ATTCTCTTAAGAGGTTTGTACTAAGtaattttattaatcattttacattttattttgcattaaaattgaaaaatgattattgaatcctt
 I L L R G F D Q E
 ataaataaataaataattacttacttttaaaattttgaaaatttttaggAAATTGCTGAAAAAATTGGTGAATACATGGCAAGACACGGA
 I A E K I G E Y M A R H G
 ACCAAATTCATCCGTGGTACTGTACCTCACCATATTGAAGCTACTCCTGATGGCAGAAGACGTGTAGTTTGGAAATCTCCAGTAG
 T K F I R G T V P H H I E A T P D G R R R V V W K S P V E
 AAGGTTAGGGAGATGTTGAAGAAATTTTCGACACTGTTATGCTAGCAATTGGAAGAACATCTGATACCAAGAATATCGGTGTAGA
 G Q G D V E E I F D T V M L A I G R T S D T K N I G V E
 GACTATGGGTATTAAAACAAAGCCCAATGGAAAAATTATTGCTAACGATGACGATgtatatatttttattataagtttattctttac
 T M G I K T K P N G K I I A N D D D
 ttgatgttaataataaattttgttcaaatattatttttaacataattttttatacacttaataacaaatatattgaattttttgttaa
 aatttatatagACCCTAATGTTGAAAATATTTTCGCTATTGGTGATTGTGTAGACAAGAGACCAGAATTGACTCCTACTGCTAT
 T T N V E N I F A I G D C V D K R P E L T P T A I
 TAAGGCTGGAAGACTTTTAGCTCGTAGATTGTTCAATGGTGACACTAAACTCATGGATTACAACCTCCATTCCAACCTACTGTTTTCT
 K A G R L L A R R L F N G D T K L M D Y N S I P T T V N
 ACTCCTATTGAATATGGTACCATTGGTTTATCTGAAGAAGATGCCAAGACTAAATATGGAGAAGATAACATTAAAGTTTATTACT
 I K V Y Y S I F T P L D W S Y S D H K H D D N I K V Y Y S
 CAATTTTCACTCCTCTTGATTGGTCATACTCTGACCATAAGCATGATGACAAGGGTCACGCCAAGTTGATTGTCAATAAGGCTGA
 I F T P L D W S Y S D H K H D D K G H A K L I V N K A D
 TGACGAGCGTGTCTGGTTTCCATTATCTTGGTCTCATGCAGGTGAAGTTACATAAGGTTTGTCTATTGCCCTCAAGTTTAAAG
 D E R V V G F H Y L G P H A G E V T Q G F A I A F K F K
 GCAACTAAAGCTAACTTTGATGATGTCGTTGGTATTTCATCCTACATATGCTGAAGtaattaaattttttttttacatttaaat
 A T K A N F D D V V G I H P T Y A E E
 aaataattttataaattattattaaggAATTCACAACCTTTGAAGAATGTCAAAGGAGAGGGTGAAGCCTAAGAATCAGGCTGCTGAG
 F T T L K N V K G E G E A Q E S G C U G
 GTTGAATCGAGCCAACCTGCTTATGGATAGGGCAGTTGGCGATGATCTCATCGTCCCACCTCCATATATTAAAGTATTTTGTGAAA
 Stop
 AGAACATATGACTACACAGATCAAATAAATCTTGAACATGTCTATTTTGTGGAGTGCTATTGTTTCATACAAATGTGATGA
 AATAATACCTTCAACTGGTAGGAATATAATGATTAGAGAACCTCAACCTCACTGAGGAGGGTTTCTATGAGGCAAGATTATTG
 ATTTTGTGTAGTTTATAGGTTACTTTTTGGCATAAATACTTTTCTTTCTTTCTTAAACTTAATAACTCAAATACTAACTATTTT

Figura 24A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtTrxR1* (THERM_0004766). La secuencia aminoacídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Los intrones se muestran en azul y en minúsculas. Las regiones sombreadas en amarillo muestran los cebadores utilizados para la RT-PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente. Se indica subrayada en la región 3'UTR la secuencia (SECIS) responsable de la traducción del codón Stop UGA como Sec (U).

ATGGAAATAGAAATTTAAGAAGAATTTGATTTCTTTGTCATAGGAGGTGGCTCAGGAGGATTAGCAGCTAGTAAAGAAGCTGCTT
 M E I E I Q E E F D F F V I G G G S G G L A A S K E A A Q
 AATTTGGTGTAAAGTAGGCTTAGCTGATTTCTGTTGACCCAACCCAATAGGTACTAAGTGGGGATTAGGAGGTACTTGCCTTAA
 F G V K V G L A D F V D P T P I G T K W G L G G T C V N
 TGTAGGGTGCATTCTTAAAAAATTATGCACTACGCAGCCACATATGGTGAAAGTATGGAGATGTAAAGAATTTCTGGTTGGAAA
 V G C I P K K L M H Y A A T Y G E S M E M Q R I S G W K
 AATGTGAATGAAGAATAAAAAACCCATGAATGGTAAAAGCTAGTCGAAAGAGTACAAAATAATGTTAAAAAGACTAAGTTTGGAT
 N V N E E Q K T H E W Q K L V E R V Q N N V K K T N F G Y
 ACAAAGTGGCAGCTCCGTGAGAACAAGTCAAATACTTCAACTACTATGCTTCTCTTGTGATAAAAAATACTATCAAATTAGAAAA
 K V A L R E N K V K Y F N Y Y A S L V D K N T I K L E N
 CAAAAAGGTGTTATTTATGTGAAGGCTAAGCATATTTCTCATCAGCGTTGGTGGTAGACCTAATTATTTACCTCACATAGATTCT
 K T G V I Y V K A K H I L I S V G G R P N Y L P H I D S
 AAGTTAATTATTACTTCCGATGATTTGTTTAGTTTGCAAACACCTCCAGG**taattttttttttttttttttttat**taataataaataa
 K L I I T S D D L F S L Q T P P G
ttaaataaataattataacttattttatcaataattttaataaaaaactattaggAAAAACATTAATTGCTGGTGGCTCTTATAT
 K T L I A G G S Y I
 CGCTTTAGAATGTGCAGGATTTTTGAATGGTCTTGGTTATGATGTTACAGTTTTATATAGATCTGTATTACTCAGAGGCTTTGAT
 A L E C A G F L N G L G Y D V T V L Y R S V L L R G F D
 TAGGATGTTGCAGAGAGAATGTAAACATATATGGCTCATCATGGAGTTAAGTTTGTATAAGGTGAAATTAAAGATGTTAAGTAAT
 Q D V A E R M Q T Y M A H H G V K F V Q G E I K D V K Q L
 TAGAAAACGAACTAAGTAAGTAGTTTATACAAATGGTAGCTCTGATACTTTTAACACAGTCTTGCTGGCAATAGGAAGAATACC
 E N E T K Q V V Y T N G S S D T F N T V L L A I G R I P
 AAACACAAAAAATTAGGTCTAGAAAATGTTGGGATACCTGTAACATAAAGTGGTAAGATTCAGTCCGATGATCTTGATCGTACA
 N T K K L G L E N V G I P V T K S G K I Q S D D L D R T
 ACTGTTGAAAATATTTATGCTATCGGTGATGCAGTAGAAGG**tataaaattttttattgttaattagaaataaatttcaattttaaa**
 T V E N I Y A I G D A V E G
aatttaagaaaaattttttatttaaaaaaataatattttaaataggACGTATGGAATTGACTCCTTTGGCTATAAAAGCAGGAAGA
 R M E L T P L A I K A G R
 TATTTGGCTCGTAGACTTTTATAACAATGAAAACATTTCTTTAGATTACAAAATTGTACCAACTACTGTATTACTCCTATTGAAT
 Y L A R R L Y N N E N I S L D Y K I V P T T V F T P I E Y
 ACTCTGCAATAGGTTTAAACAGAAGAAGAGCTATTTAAACATATGGCAGTGAAAATGTATGGTCTTATGTTTCTAAGTTTAAACC
 S A I G L T E E E A I K T Y G S E N V W S Y V S K F K P
 TCTTGAGTGGGTTCTATCAGATAAAGATAATGATTCTAGAGGTTATTGTAAACTAATTGTGCATAATAAATAAATGAGCGCGTA
 L E W V L S D K D N D S R G Y C K L I V H N K Q N E R V
 TTAGGCCTACATTATTTAGGACCTCATGCAGCAGAAGTAGCTTAAGGTTTTGCAGTCGCTATGCAATTAGGAG**GCTACCAAGGCAG**
 L G L H Y L G P H A A E V A Q G F A V A M Q L G A T K A D
ATTTTGATAAGACTGTTGCCATCCATCTTCTGCAG**AAGAGTTGGTGCTTCTCAAG**CAAATTAAGGGTATCAGCGAAACTGA
 F D K T V A I H P S S A E E L V L L K Q I K G I S E T D
 TGAATGGTTATGTTGTGGC**TGA**
 E W L C C G Stop

Figura 25A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtTrxR2* (THERM_00142420). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Los intrones se muestran en azul y en minúsculas. Las regiones sombreadas en amarillo son los cebadores utilizados para la RT-PCR. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

Anexo II

ATGTTTTTGTAAAGTAAAGAGAATAAATTCTGGGTAAAGATACTACTTTTCATCTAACTAGTAGTAGAATTAACATCAGAATTATT
 M F C K L K R I N S G L R Y Y F S S N Q Q Q N Q H Q N Y F
 TTAATTTTTTAAATTAAGATAATAATTCTACATCACAGCAGTCTGCAACAATTTGAATTTAAATGAAGAAAAATTATCAAAA
 N F Q N Q D N N S T S Q Q S A N N F E F K N E E N Y Q K
 GAATGATAACTAAGGTTTCATAAAATTCTTAGTTTGATGAAATTGAATTACCACCTTTTCAGATTAGCAAGATGAAGATGAAAAG
 N D N Q G S Q N S Q F D E I E L P P F S D Q Q D E D E K
 CAGGATGAAAATAAAATTTAGTATTTATCCCAAGAAAAAATGATATTTTGCATCAAAAATATGATGTTGCCATAATTGGTGGTG
 Q D E N K I Q Y L S Q E K N D I L H Q K Y D V A I I G G G
 GATCTGCAGGTTTGTCTTTTGCTTTAGAAGCTCATAAATTGGGAATGAAAACAATTTTATTTAATTTTGTAGAACCTACATTCAG
 S A G L S F A L E A H K L G M K T I L F N F V E P T F R
 gtaccccaatgttttttcttagtttaagacactatttgtttcgttatattcaatcgatttttaataattaatagAGGTAATAA
 G N K
 ATGGGGTTTAGGTGGGACTTGTGTAATGTTGGATGCATACCGAAAAAGTTATTCCATACTGCATCTATTATTAAGGATAGCTTA
 W G L G G T C V N V G C I P K K L F H T A S I I K D S L
 TTAATTAAGGATAGCTTAAGGATAGCTTAAGGATAGCTTAAGGATAGCTTAAGGATAGCTTAAGGATAGCTTAAGGATAGCTTA
 L K S A D F G F G G D R Q Q F Q I D L D H N N E P K N K Q
 AACTCTTAAATTTTAGATGGAGACAACCTTGTCTAATGTACAAAATTATATCTCTGATTGAACTTGGGATTGGAAGCTCAACT
 L L N F R W R Q L V S N V Q N Y I S D L N L G F E A Q L
 CATTAATAGGAGTATCCCTTATGTGAATGCCTTAGCTACTTTAGGCGATAAAAAATACTATATACTATAACAATAAATATGAT
 I N R S I P Y V N A L A T L G D K N T I Y Y T T N K Y D
 TTATATGATGCTATTTAAAGAAGAGATTTTCTAAATTAATTAGCTAGCAAATTAAGGCAGATTACATAGTCATAGCAGTTGGGG
 L Y D A I Q R R D F S K L I S Q Q I K A D Y I V I A V G G
 GAAGACCAAAATATATTAAGAATGTGAAAACAGTGAAAAATATCTATAACGAGTGATGACATTTTCTTTAAAAAACCTCC
 R P K Y I K E C E N S E K Y S I T S D D I F S L K N P P
 TGGAAAACTCTAGTTTTAGGTAGTGGGTATATAGCTTTTGAAGTGCAGGATTTTGTAGTAATTTAGGGATGAATACAACGTTA
 G K T L V L G S G Y I A F E S A G F L S N L G M N T T L
 ATGGCAAGAGGTTAATATCTTCGTGAATTCGATCAAGATATTGCTTAGATGATAGTTGAGGACATGAAATAATTTAATGGTGTAC
 M A R G Q Y L R E F D Q D I A Q M I V E D M K Q F N G V R
 GATTTCATATAGCATTACGTTCTTATAAATTTGAAAAAGATGATAAGATTATGTTGTATGCTACAAGAGTATCAAAAATAATGA
 F I Q H S V P Y K I E K D D K D Y V V C Y K S I K N N D
 CGAATAATGTGATAAATCTAACTGTATTGCAAGCTGTTGGAAGATAGCCAAATGTTTCATTATTAAATTTAGATCAAAATAGGA
 E Q C D K F Q T V L Q A V G R Q P N V S L L N L D Q I G
 GTTTAAGTCCATCTGAGACAAAAAgtatlttgttttattgttttctaaaaatatttttagtttaataattttatttactcta
 V Q V H S E T K K
 gacagacttatcaaaattaagacctagtttgtttaataataaaaatttaaaataaaaataatgaaaacaataaaaaaacacattatt
 acattttaagggtagaggggagggaggaactgaattcaatttttatatatagactaaaatttaattgaaaatgcaaaaatatgggtt
 tttctttattttataattttcaaaataataacctccaaatctcaaaaattaaattaatttctacctatttttataaaaattttt
 tttgaaagaactctgatttttgattatataaataactaaactaggtcttaatttagtgatgatttatagaatccttttttaattattt
 aatttaaatataatttaacgctagATTATTGGAGGTTATAATGAAGATAGTGAGAGAAGCTTCTGTGGATAATATATTTCTGTAG
 I I G G Y N E D S E R T S V D N I F S V G
 GTGATGTGCTACATGGtatltttattaaattaaaaatttaatatattttattttatgcatlttttattaaaggAGTACCTGAACCTCAAT
 D V L H G V P E L N
 CCTATTGCTTAAATGTCTGGAAAGCTTTTAGCACATAGAATATTTGGTTTAAAAATGAATGATAATATGAAATATTACAACAGAC
 P I A Q M S G K L L A H R I F G L K M N D N M K Y Y N R H
 ATAAAATGGATTATAATTGTATTCTACTACTCTGTTTACACCTTAAGAATACAGCTTTGTAGGGTTAAATGAAGAATAAGCTCT
 K M D Y N C I P T T L F T P Q E Y S F V G L N E E Q A L
 TCAGCAATATGGTAAAGATAGGGTAGAAATTTATCACTCTAGATTCACTCCTTTAGAAGAATAACTTACTTTTTCTTATGATGAC
 Q Q Y G K D R V E I Y H S R F T P L E E Q L T F S Y D D
 CAGGGCAATATCATCAAAAGAAAAAGTTATTGTAAATTGATTTGTGATAAATTTGATAATAATAGAATTCTAGGTATGCATTATT
 Q G N I I K R K S Y C K L I C D K F D N N R I L G M H Y F
 TTGGCCCTAATGCAGGTGAAGTAATGTAAGGCTATGCTGTAGCATTTAAATGAATCTATTTAAGCATCAATTAGATAGTAGTGT
 G P N A G E V M Q G Y A V A F K M N L F K H Q L D S S V
 TGGTATACATCCAACATGTGCAGAAGAACTGCTCAATCTTAAAGTTACAAAAAGCTCTGGTGAGGATTTTGATAAGAGACTCATGC
 G I H P T C A E E L L N L K V T K S S G E D F D K D S C
TCAGCTTGATTTTTACTTAAAAATCTCTTATTGCTTTGAAATTTATATATCTTAAAGATGTATAGTATAATGATAGCAAAATCTCG
 U R Stop
 AAAATCTTAGGATTGGGATTAGGCTTGAATAGTCAGAGTAATAAGAGTATTTTATTAATAATTTTAAATTCATAAATTAATTTA
 TTTATTATAATCAAAATATTTTCAAA

Figura 26A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtTrxR3* (THERM_00486500). La secuencia aminoacídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Los intrones se muestran en azul y en minúsculas. Las regiones sombreadas en amarillo son los cebadores utilizados para la RT-PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente. Se indica subrayada en la región 3'UTR la secuencia (SECIS) responsable de la traducción del codon Stop UGA como Sec (U).

Figura 27A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtTrxR4* (TTHERM_00823430). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Los intrones se muestran en azul y en minúsculas. Las regiones sombreadas en amarillo muestran los cebadores utilizados para la RT-PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente. Se indica subrayada en la región 3'UTR la secuencia (SECIS) responsable de la traducción del codon Stop UGA como Sec (U).

ATGAATGAAGAAGAGTTTACAAATTAGCACATTATTAAAAATAATAATGAAAGCAAGTAAATCATCCAAACTCGAGTTCCTTACA
 M N E E E F T N Q H I I K N N N E S K Q N H P N S S S Y K
 AAGGAGCTCTTGATTAGCAGTAAGTGATTGAGCAAAAAGAAAATTAGATTAAAAAGAACTGAAGCGCACTTAAACGATAAAAAATAT
 G A L D Q Q Q V I Q Q K E N Q I K R T E A H L N D K N I
 TGCTTTTAATTAAAAAATACAACATAATAATCATGTTGATCAGCAGGTATTTAACACAGAAGGAAATTAACCAAGATAAAAAATAA
 A F N Q K I Q H N N H V D Q Q V F N T E G N Q P R Q K Q
 GAAAGAAAATTATCATATCTAGGTAAACTAACTATAGCGAAAAATCAAAGAGGAGTCTCAACTTAAACCGCCAAAAAATACAA
 E R K L S Y L G K T N Y S E K S K E E S Q L K P P K N T K
 AAGGAAAGGTAGAATACGATATAGTTAAAGATTTTTTAGTTAAAACTTATACTGATTAATGCGAAGAAGATGGATAAATGGAAC
 G K V E Y D I V K D F L V K T Y T D Q C E E D G Q M E L
 GATATAAATGCCAACAAAAGGTCAACTGTGAGGAGAAAAGGGAAGAAAACGCCAATCAAAGTACAGAATATCTATTAAGAAGCA
 I Q M P T K R S T V R R K G K K T P I K V Q N I Y Q E A
 CAGCAGAAAAAATAACTTAATGATGTTTTCTAGTACACAATAGTTGACAATAAAAAAAGAGACAAGAAATTAAGTTGAAACAAA
 Q Q K K Q L N D V F Q Y T I V D N K K K R Q E I K L K Q R
 GATTAGTTAGAGAAATAAGTATAGATACTCACTCTACGATTACAGAAGAATCAAAGATAACTAATTAATTTTATAAGACTAAAA
 L V R E I S I D T H S T I T E E S K D N Q L I L Q D Q N
 TCTTTCCAATAAATAAAGACAAAAATCCTCGTCCTTTTACTTAGATAATAAAAAATGATAAAAGCCAAACCAATTTAAATAATACC
 L S N K Q R Q K S S S F Y L D N K N D K S Q T N L N N T
 CATATTCAAACCTATTCAGGAAGAACCAGATGTTATTGTCATAGAAGATTCTTATCCTTTGGAGTGGGATCCTGGATTAAATAAGA
 H I Q T I Q E E P D V I V I E D S Y P L E W D P G F N K K
 AGGCTCGTAAAAAATTAGATTTAATTAATCAAACAAGATCAAATAATACTCTGCCTATATTAGATTTAAGCAACACTAAAAATGT
 A R K K L D L I N Q T R S N N T L P I L D L S N T K N V
 AGAAAAATATAGACATATCTTAAATAGTAAATAAGGATGGCAACCCTTACTTAATACTCCTTTCTTACCTATAAGTCCCTTAAAT
 E K Y R H I L N S K Q G W Q P L L N T P F L P I S P Q N
 TAACTTAAGAAGGCAGATCTTTTTAAGAATTTATTAAAGGAGTAGAAAAACAAATTTACAAATCTAGAACTCCTGTAAAAATCTC
 Q L K K A D L F K N L L K E Q K N K F H K S R T P V K S R
 GTGTTAGAGAGAGATAGAATAACTTGTAATAAATGAGGAGAGATATTACTTACAAAATAAACTAGTATAGAATTTGATCCTAA
 V R E R Q N N L Q N K W G E Y Y L Q N K T S I E F D P K
 AAATGTTTTTATATAAGAAAATAAGATGTAGAGTAGAAGGAAGAACTATTAAAGCAGCTCCCAAGTGAATTAATTAGAACTAA
 N V F I Q E N Q D V E Q K E E T I K Q L P S E L N Q N Q
 AAGCCTAAATAGCAATAGATTTAAAGTATTTATTCAAATACAAACAAAACGCTAGCAATAGACCTAAAACAATTAAGAATTAC
 K P K Q Q Q I Q S I Y S N T N K N A S N R P K T I K E L P
 CCAGTTAGGTTACAGAAGTCGAAGAAAGCTCATAACTAGTAGCATGAAGCCTGGATCTTAGTGTATCAATTAGACATTAGACTT
 S Q V T E V E E S S L T S S M K P G S Q C I N Q T L D F
 TAATAAGACTCTGGTAATGTGCAAGAGATTAATCAAAGAATTGGTTAATTGATGTAAATGATGCCTTTAAAAAAGAAATTCCT
 N K D S G N V E E I N Q R I G Q L M Q M M P L K K E I P
 AAATAGAATTAAGTTTAAAGTAAACACCTATAAGAGAAATGAGTTAATAAAGCAGAGTTTAAACAGCAAACATAAAAAAATTTG
 K Q N Q S L K Q T P I R E M S Q Q S R V Q T A N I K K F G
 GTAACAGAAGAGTATTGAGGTACAATAGTAATGAAAATAAAGTGTGAGTAATTTTACTAAGCAAAAGAAGATAACTTTTTTGA
 N R R V L R Y N S N E N Q T V S N F Y Q A K E D N F F D
 TAAAGTGGTTAATAGAATTTATATAATTATAATTAAATGTAAGTAAATCTCATGATTTTTTATAGCAAATGCTCATTGTGCGAGT
 K S G Q Q N L Y N Y N Q N V S K S H D F Y S K C S L S S
 AATAAATTAATTAATAGCAGAGAATAATTAATGAATAGTCCACTATCAAAGATTAGCAAATTAAGTTAAATACCTTAAAGTTATT
 N K L I N S R E Q L N E Q S T I K D Q Q I K L N T L S Y S
 CTACAATAAATTAGCCAAGAGAAGAATAGAGTTTAAAGGTTCAAATTTCTATTAAAGCATTAGGAGTCAAAGAAAGTTTTTAGGT
 T I N Q P R E E Q S L K V Q N S I K H Q E S K E S F Q V
 CAACAAAGAAATATTATTAACTAAGTAAGTTTCTATAGAGGAGCAACATAAAAAACCTATAATATCTTAAGATTAAATAATGGA
 N K E I L L T K Q V S I E E Q H K K P I I S Q D Q N N G
 AATCATTAGAAAATAATGTATAAAATATATAAGAACTATCAAATTTAACAAAAAACACACTTAAAGAAAAATAAATTTCA
 N H S E N N V Q N I Q E T I K I Q Q K N T L K R K I N F T
 CAAATAAGCCAATTTATATAAATTATTAAGATTAAAAATGCTTACAGAAGGTGACCAAATTAATATGAAAATCCAGATTTGAA
 N K P I Y I N Y Q D Q K M L T E G D Q I E Y E N P D L K
 ACAAACTATTAAAGGTGTAAGAAATGATGATTTAAGAGTAAAAATTAAGTAACAGCTAAGTATTCTGCGATCTCAAGGTGATAGA
 Q T I K V Q E M M I Q E Q K L K Q Q L S I L R S Q G D R
 GTTAATAAATTAGACAAACATTTTATTATAATGATGAAGGAAACAGCTTTTAGTCTTAGAGGGTAACTCCTTTTACAAAAGAAA
 V N K L D K H F Y Y N D E G N S F Q S Q R V T P F T K E R

GAAGAAGAGAGACATAGACACCTGTTTGTGAGAAAACTACAGTAGCTTGACTCCAGTGAATAACTCAAATTAGAAAAATTAAAC
R R E T Q T P V L R K N Y S S L T P V N N S N Q K N Q T
AAACTATTAAACAAATAAATAACAAATGTGTACGATATATAAAACGAAGCTAATCACTATAGCAATTAAGAAAGATAGTTTAA
N Y Q T I N N T N V Y D I Q N E A N H Y S N Q E R Q F Q
AATGCTATATCCATAGAGAATAATTAAGAGATTGAAAAATAATAATGATTAATATTACAATTAATCTATTACAGACTTTAAATAATA
N A I S I E N N Q K I E N N N D Q Y Y N Q S I Q T L N N N
ACTAATCCACTATTTCTACATTGGCAAAAACTAACAATTAGTAATAAATTATCAGATAAAATATATCTAACAAATTATAGAATCG
Q S T I S T L A K T N N Q Q Q I I R Q N I S N K L Q N R
CACACCTATTCCTAAAAGAACAACAGATAATTAATGAAATCAAAATCTTTCTAAGTCACCAATCAACAATAAAAAAACTATT
T P I P K R T T D N Q N E I K N L S K S P I N N K K T I
ATTGTCAGAGATAATTTATCTCCTCATTAACGAATTEATTGTCTAGCAGGGTTAAATGTCAAATTAATACCTTTAAATAAACTA
I V R D N L S P H Q R I Y V Q Q G Q M S N Q I L Q N K T N
ATCAAAATATAACCTTGTAATAGCCTAGTTATTATAAATGAAGAAAATTTATATAATCAAACTTCTCAGAAAATTTTAAACAATTA
Q N I T L Q Q P S Y Q N E E N L Y N Q T F S E N F N N Q
GCAAAGCTTTAGTAATTTTGAATAAGAAATTTCTGAAGATTAAGAAATGTAAATATCTTTACTAAAACATtaatttgataaacatc
Q S F S N F E Q E I S E D Q E M Q I S L L K H
atttaaaactgctatgtataaaccaaaaaaactaattaataacaaaggagatatgtgtaacaatcatttatttgataaatttgaa
tgtaaatcaactaataaactatcttatttataataaatgataaaaaataaatacaactaattaatttcaaataaaaaatatttt
tgacottgctaacaataaaatttctaaaaataaatagaaaatttaagaaaatattcaatgagatagataaataatcaatacat
atattttgagtaaaatttatgattaattaaaaagaattcattctcgaagttactctcaaaaaggatttaattattataaataaat
tctagatttattcttttcaatagtagtaaatgaaggtactttttgtatttaaaagtttgattattatttataaactaaacacac
ttatatgcagaatatttatataaaaaattaaaaatttatcttcaaaaaatttattatttttcaaataaatttgctcaaagtttta
tttaattttagaataaaaaaATGATAAATAAATTTTAGAAACATTTTGTGACAGTTAAGCGAGATTGGTTTAGAGTTTATTTTC
M I N K F Q K H F V D S Q A R F G L E F I S
TAGAAAAATTTTAGTTTCAAAAAGATAGACCTTAATATAAGAAATAAGAATAAAACAAGGAATTTGATTCTTTGTTATTGGA
R K Y F S F K K I D L N I K K Q E Q N K E F D F F V I G
GGAGGATCTGGAGGATTAGCTGCAAGTAAAGAAGCAGCTCAATTAGGTGCTAAAGTTGGATTGGCAGACTATGTTGCTCCACGC
G G S G G L A A S K E A A Q L G A K V G L A D Y V A P T P
CAATTGGTACATCTTGGGGTTTAGGTGGGACTTGTGTAATGTTGGTTGTATTCTTAAAGTTAATGCATATTGCTGCATAATA
I G T S W G L G G T C V N V G C I P K K L M H I A A Q Y
CGGTGAAAGTTATGAATAGTAAGAAATATCTGGATGGAATGTAAACAGATAGTCAATTCAAATAATGGATTAGCTAGTACAT
G E S Y E Q Q E I S G W N V N R Q S I Q N N W I Q L V H
AGAATTTAAGAAAATGTTAAAGAACTAACTTTGGTTACAGAGTATCTTTAAGAGAAAATAAAGTCACTTATTTTAATTCCTTAG
R I Q E N V K R T N F G Y R V S L R E N K V T Y F N S L A
CAACTATTATTGACTAAAACACTATTAAGCTTTAATCAGGTGAATAGCTTAAAGACGCTATTTATGTGAAGCAAAATAAATTCT
T I I D Q N T I K L Q S G E Q L K D A I Y V K A K Q I L
GATAAGTGTAGGTGGAAGACCAATATTTACCACATATTGATAGAAATCTCGTAATTACTTCAGACGATCTATTTAGCTTGACT
I S V G G R P N Y L P H I D R N L V I T S D D L F S L T
AAACCTCCAGGtagctttttttaatttaataataaattttaaataaatttttaattaaatttaggCAAAACTCTTATTGTTGGAGC
K P P G K T L I V G A
TTCTTACATTGCACTAGAATGTGCAGGGTTTTTAAATGGACTTGGGTACGATGTTACAGTTCTTTACAGAAAACAAATTTTAAAT
S Y I A L E C A G F L N G L G Y D V T V L Y R N K I L S
GGATTTCGATTAAAGATGTGGCTTAAAAATTATAAGAAATATATGAGCTATCATGGAGTTAAATTTGTAAAGATGAAATTAAGCATA
G F D Q D V A Q K L Q E Y M S Y H G V K F V K D E I K H I
TATCAACCCACAACGAAAGCTAAAGAGAAGTTACTTTTAATTTTGGTGGATAAAAGGAAATATTCGATACAGTTATGTTAGCTAT
S T H N E S Q R E V T F N F G G Q K E I F D T V M L A I
TGGCAGAGTTCCAAACACTTAAAGTCTAGGTTTAGAAAATGTTGGAGTTAAATTATCTAAAAATAGAAAAATACTAGCTGATCAA
G R V P N T Q S L G L E N V G V K L S K N R K I L A D Q
AAGGATTAAACATCTGTAAGCAATATATTTGCAATAGGAGATGCTGTTGAAGGtaacttattagcttttagtttttttaaaata
K D Q T S V S N I F A I G D A V E G
aataattttattttaataataggGAGAATGGAATTAACACTGTGGCAATAAAATAAGGGAGATTTTTGGCTTAGAGACTTTTTAA
R M E L T P V A I K Q G R F L A Q R L F N
CAATTAATAATGAACCTGTAGATTATAACACTATCCCAACAACTATATTTACACCTTTAGAATACTCTGTATAGGATTGAGTGAA
N Q N E L V D Y N T I P T T I F T P L E Y S C I G L S E
GAGCAAGCAATTTAAAGTTTGGATAAGAAAATATTTGGTGTATGTTTCTAAATTCAAACCTCTAGAATGGACTTTTTCTGAAA
E Q A I Q K F G Q E N I W C Y V S K F K P L E W T F S E K
AAGACAATAAATCAAGAGGATACGTGTAACATAATAGTAAATAGATAAGATAATGAAAGAAATATAGGCTTACATTATTTAGGTCC
D N K S R G Y C K L I V N R Q D N E R I I G L H Y L G P

TAACGCAGCTGAAGTGGCTCAAGGATATGCTGTTGCATTTTAAATGGGAGCTACTAAAAGAGATTTTGATAAACTATAGCCATA
N A A E V A Q G Y A V A F Q M G A T K R D F D K T I A I
CATCCTTCCTCTAGCGAAGAATTGTATTACTTAAGTAAATTAAGGGCATATCTGAGACAGAAGAGTGGTTGTGTTGTGgttgat
H P S S S E E F V L L K Q I K G I S E T E E W L C C A Stop
ttaatattttattttgttaatttttatcattaataaaaaatttcctaattctcaaaagaaaaaaattatataaagcaaacagaat
taatttaacgtctaattttataaaacttatttttaatactaaaaataaaaaattaaatgatttaaaagtttaatttttaatacacttttagt
tggttgattgtctttgttaaattatcaaataattttattttgttaaataataaaattaaataataattataggttaatttaaatgaaaagc
tttttagttcaattaaaaatcaatattgtttaatttttaattttttatttttaattcatttttttaaaatacatttttaggatttttaata
aaaaatgtaaaaaaattttatgttttcaagtagattttattttgttttattaaacaaaatttttgaaagacaaataaatcaattta
gtatgattaataatttttgataaactttatattttgttttattacttttagtttgataaatattttataagcactaattacatatttt
ttttttgattggtcattttattaaacagCTGATTTCATTCAAAAATAGAGTTTAAATAATTAGGGTAAATAGAAATATAATTTTTTA
D S F K N R V Q Q F R V N R N I I F I
TTCAATAAAGTATTGAGAGAGATACAAATAAGCGAATGGCAGAATTCACCTTACCATGATTATCTCTTGCACAAAGTTGTCTAAC
Q Q S I E R D T N K R M A E F T Y H D Y L L H K V V Q P
TTATTCAATAAGAGGTTAAACAGTGAAAGCGCTAACTTAAAGAGAAATATACCCCTTTATATGACTAGATAAGCAGGGAAAGTG
Y S I R G Q N S E S A N L K R N I P L Y M T R Q A G K V
CGCGAATAGCATTAAGTTGAATCAAAAAACATAGTTACTTAAATAGGCTGTTTAAACCACCCAGGTTTTCTTGATTCTTAGTTTG
R E Q H Q V E S K N I V T K Q A V Q P P Q V F L D S Q F E
AAAACTTTAGCAATAGCAAGAAGGTTTATATCATAGAAAGCCTGGTATAGATACTAATATAGGGATGAATAGGACAGTGAAATC
K L Q Q Q Q E G L Y H R K P G I D T N I G M N R T V K S
TATTTTTTAAATGATGATTTTAGTGATAAAATGATCCTATTTTCAAAAACATTAGAAATAGGATTTAAATGAAAAATATGTT
I F Q N D D F S D K N D P I F K N I R N R I Q N E K Y V
GATGATTTTTTATGTCTTAACAGAAGGAGCACGTCCTAGAAACACTCAAAAAGAAGAAAACTATCAATTGAAAAAGAGATTAAGA
D D F Y V L T E G A R P R N T Q K E E K L S I E K E I K T
CTGTTTTGCAAGAAAAAGTTAATGAAGACTAACTTAAAAAGCTTTACAGAAAGTACGTTTTAGAAACCATGAAAAAAATATTGC
V L Q E K V N E D Q L K K L Y R K Y V L E T M K K N I A
TCTGGAAGAAAAATGAGGATgtttgaaaagtgtattatttttatgcaatatatttcttaaaaagatgtttaatttttttattta
L E K K M R I
aaacttagAGAGCATGAAGTTAAATTTGGTTCGTTGCAATTAATTGACAACAGGAAAAGTTCATTAAAAATGTTCTGAAGATT
E H E V K I G S L Q L I D N R K S S L K N V P E D Q
AACAAATAATAGGAAAGTCAGCAAGTATGGCTGCTATAAATGGTACTCACTCTCTGTCTTATAGAATTCTTTTGAATAAAATCA
Q I I G K S A S M A A I N G T H S L V L Q N S F E Q N Q
GAAAGCAGAAAACTGGAGTCTTTTATAGACCCTTCTAAGGTTTTTGGGCAAGAAACAATGTCTTAACTAAAAGATCTTGAATAA
K S R K L E S F I D P S K V F G Q E T M S Q L K D L E Q
GACAGACCAAACTAAATAAAATGCAATAATCTAAATAGGCTATTAATTTTAAAGTAGAGACTAAGTGGATTAAAGTTAG
D R P N Q N K N K L Q Q S K Q A I N F K Q R L S G L K L D
ATTTTTCTAACAAACCATAAATGAAAGAAACATCAAGTAAACTTgtaagaatataaaatttagttttttcatttttaataatta
F S N K P Q M K E T S K Q T Q
atgcatactattaataatcactttttctgaaaaaaaaaatattcaattcagtaaaaaaatggacttttttataaaaaataaatta
aattaaacatattttaacattgctttaatttttaaaaaataataaagaAAGAAGCAAGCTCCTAAATAAGCTCATTTTAAACTCCTA
E A S S Q I S S F Q T P I
TTGCTGCAATAATTTTTTAAAGCTATATATAAAAGCAGGATTCATTTGAGCATGATGAGGAAGAACTGTTGAACAGTATTAAAT
A A N N F Q S Y I Q K Q D S F E H D E E E T V E Q Y Q M
GAAATAACTACAAAACTTTAGGAAATAAATAAAAAGTAACAACAATACAAATACAATAAAGAAAGTGAGAAAGCTCATATA
K Q L Q K L Q E I N K K Q Q Q Y K Y N N K E S E K A H I
AAAAATTTATGTAATTACTTCGATCTAAGCTTGCAAAAACCTGCTTAATTTAGAAGATAAAAAGCAATgtaaatttagtacaatg
K N L C N Y F D L S L Q K L L N L E D K K Q Q
ttatgctctttttttcaagatttttattttataaatagtgaagcagaataatgtgaaaaatttagcagaattacttttagAGAGTG
S E
AAGGAGATTCTGAATAAGAAGAACATTTTTGATGATATTGAAGGATTAGATGATGATAGTATGATAATCGATAAGAATGACAATAC
G D S E Q E E H F D D I E G L D D D S M I I D K N D N T
CTAAGATTTAGGAGGCAGCTAGCAAACTAGCAGGAAAAATTTAAGATAAACAAGGAGCTAATATAGTGCAATAAAGAGAAGAA
Q D L G G S Q Q N Q Q E K F K I N K E L I Q C K Q R E E
GAGGTGTTATTTGAAAGAATAAAGTATGAAAAATGAATAAAATATCATAAATGAATAGGATGAAAAGCTAATTTAAAGTATAATTA
E V L F E R I K Y E N E Q N I I N E Q D E K L I K S I I N
ATTTAGAAAATAAGCAAGCAATATTCTAGAAGTATGTCCAAAAAAGAAAAGGCAACTCTAATTATAAAATTTGCTCAACTTAA
L E N K Q A I F Q K Y V Q K K K R Q L Q L Q N L L N L K

```

GGAGCAGTAAATGAAAAATAATTTTAAACTCTGTCTTTACTAGCTCAAGCCATTAAAGAGCAAGCAGACTTAAAATACCAAG
E Q Q M K K Q F Q N S V F T S S S P F K S K Q T Q N T K
CAGAGTGAATTAATAAACTAATCAATTTAAAGTTTATCTAACATGAAATCTAGAATGAAATTTCTCAACCAGAAGACTTTGTTA
Q S E L K N Q S I Q S L S N M K I Q N E I S Q P E D F V K
AAACTAATGTTTAGCTAGGAAGATAAACATCATATAAAATGTAAATGGAAACCTGTGCATGAATAGTCTGTTATTTTCCTTTT
T N V Q L G R Q T S Y K M Q N G K P V H E Q S V I S F L
AAAATCAGATCTTAAATATTAGATTCACCAAAGTCTAAATTTATAAACCTTTTAAACAGAACAACAAGCAATAGGATTTAATT
K S D L K I L D S P K S K I Y K P F N R T T K Q Q D L I
ACTTAAGGAAGTGATACTTCTTCTAAAAAGTTAAATCTTGTAAGATTAACTTAACCTATCAGCTCCAAATATGCTAATTAATAgT
T Q G S D T S S K K L N L V R L T Q L S A P K Y A N Q Q
aaatatattttattttattttttcattttaatttttaaaaaaatttttaattttcattattaaaaaattatttaatttgcaattttc
caaacaaactcaataaagattaaattttatgtttggtgaagttttgatccaaaattaatctcctttttcaaaaaatcttaaaaaata
aaatttttaaaataaatcaaaacttaagagcattatttttatattaagtattcaacaataatgtcaaaataacttttaaaatttctgt
taaatatttattgaatcactaataaatttttaaatctcttaaaaagggataatataaaaaattaattttttataataaacaatattat
tttttaaaactaaaaattctctaaaaaaaataaaatgtaaatcattttataactaaatttccttttttagtttttcaacttttat
tgttttaatatatttatgattgagcttattgaatataattttattttttattaaatagATTTCATGGATCAGGTAACAAGAAAAGATAGT
F M D Q V T R K D S
TTTGACTTGTTTAGTACCTAGGCCACATCAGGAAGAAAACCTTTTTTATAGTACTAATTACTCAACTTTAAAGAAAAATAAAGATA
F D L F S T Q A T S G R K P F Y S T N Y S T L K K N K D R
GAAATATTAGCAAAAGTTAACAATAGATTTTTTACACTTAAAAAAAATAAACTAGGCTGAAATTGATTAAATGAAATTAATTTT
N I S K S Q Q I D F Y T Q K K I N Q A E I D Q M K L N F
TTTAACTTTTTTGATAGCTGTTTTGATAAAAAGCATTAATTTGAAGAAGAAAAATAGAACTTAGACTTGAAATAAGTGATTGG
L N F F D S C F D K K H Q F E E E K Q K L R L E I S D W
TATTGCCAAATTAATAACAACCTCACAAGTTGTCAAATTATACAGGCCGAAGCTATCTACTCTTTCTTAAGAGTTCAAGTAGT
Y C Q N Q Q Q L T K L S N Y T G P K L S T L S Q E F K Q F
TTATTGAATAAAAGAACTTTAAAAAGAAGCTATTTAACTATTTAATAAACACAATGGAATAAAAAGATAGACAAATGGCTATTTA
I E Q K N F K K K L F N Y L I N T M E Q K D R Q M A I Y
TTTATATAAATAAGATAGATAATTAGATGACTTATGA
L Y K Q D R Q L D D L Stop

```

Figura 28A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtTrxR5* (THERM_00723630). La secuencia aminoácida inferida se muestra debajo según el código de una letra. Los intrones se muestran en azul y en minúsculas. Las regiones sombreadas en amarillo y rosa indican los cebadores utilizados para la RT-PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente. Sombreado en amarillo se resaltan los cebadores (P1A/P1B en Figura 67) utilizados para amplificar la región con homología de TrxR (región sombreada en gris) y en rosa los cebadores (P2A/P2B en Figura 67) utilizados para amplificar la región sin homología reconocible. En rojo se indican dos codones; atg y tga, posibles codones de inicio y fin de la probable tiorredoxina reductasa (*TtTrxR5*) y otras posibles proteínas.

ATGCAATAATAATAACAATAAGAATACTAGTATGATTACTTCGTGATAGGAGGTGGTTCTGGTGGATAGGCTTCTGCCAAGGAAG
 M Q Q Q Q Q Q E Y Q Y D Y F V I G G G S G G Q A S A K E A
 CAGCTTCTTTTGGAGCTAGAGTTGGATTAGCAGATTTTGTAAAGCCTAGTCCATAAGGATCAACTTGGGGTTTAGGAGG**taaata**
 A S F G A R V G L A D F V K P S P Q G S T W G L G G
aacaaataataagattcaaaaatggcaaaattaagtaatttgtaaattaataacaaataaaaggAACCTTGTGTAAATGTTGGATG
 T C V N V G C
 TGTGCCAAGAAAATGTTCCACTATGCTTCTGAATTCGGAGATATTTTAGAGCACTAAAGAAATGCTGGTTGGGAAGTTCACAT
 V P K K M F H Y A S E F G D I L E H Q R N A G W E V P H
 AACATCAATCATAACTGGAGTACTTTAGTAAATAAGGTTTAGACATACATCAAAAGGTTGAACGGCATTATATGGATGCTTTGA
 N I N H N W S T L V N K V Q T Y I K R L N G I Y M D A L K
 AAGACAAAAAGTCACTTACTATAATGCTTTTGCCTCTCTGAAGGATAAAAACACTATTTAA**gtaaaaat**tttttatttcttttta
 D K K V T Y Y N A F A S L K D K N T I Q
tcatatttttaaaattacatttttactttaactttgtctatttctactttaagtgtttatttaatacaaaataaaattcagtcagatac
 tttctaactctgttacaaactcaagatatatttaaatcaactctgatttttttcaaaaaatcattacaaaataattattattgattca
 aagcaattttatttcaataatccaaattttataattttattagaatcaataacttattttcatcataaaaaatgatttattttatcat
 caatacacagagtttatgttgaattagcgtaattttaaataaaatgactccttttaaaagatgccaaataaaaaactaattt
 tttgaaataaaaaaaataatagaaatttttacataattaatatctaaatattttatttctttttttttatttcaaaagCTTGAAGACATTAA
 L E D I N
 TGGAAATAAGACAGAAGTTACAAGCAAGTATATCTTGTAGCTCTTGGAGGAAGACCAAAATACTTAGACGAAATTCCAAATATT
 G N K T E V T S K Y I L L A L G G R P K Y L D E I P N I
 AGAGAATTAGCAATAACTTCAGATGATATTTTCTTTTAAATACTCCTCCAGGAAAAACACTTGTGTGGTGGTCTTCTATGTTG
 R E L A I T S D D I F F Q N T P P G K T L V V G A S Y V A
 CTCTAGAGTGTGCAGGATTTTGAATGGCTTAGGTTACGATGTGACTGTTCTTGTGCAGAAGTAAAGTTCTTGTCTAATTTTGATTA
 L E C A G F L N G L G Y D V T V L V R S K V L A N F D Q
 GGAGTTTGTCTCAAAGGTTAAGTTATTTATGTAGAAGCACGGAGTTAAATTTATCGAAGGTGCTGTTCCCAAGTATTAAGTTA
 E F A Q K V K L F M Q K H G V K F I E G A V P T S I K L
 TCTGAATAAGGCTAAGATCTTAAACACGTAGAGTATAAGAAT**ACTTAGACAGGTGAAC**TTGTTGGT**aaaataaatacatttaag**
 S E Q G Q D L K H V E Y K N T Q T G E L V G
attcaaaaatctattttctttttactttaatttaaaattctaaatccatttgctttaatttaggtTAAGATCACTTCAAACAG
 Q D H F K T V
 TTTTAATTGCAGTTGGTAGAGGAGCTTAAACTAAG**GGCGTTAACCTTGAGT**AAGTTGGAGTTTAGTTGACAAAAGACGGAAGAT
 L I A V G R G A Q T K G V N L E Q V G V Q L T K D G K I
 TGTCTGTGATGATAGTACTACTGCTATCCCAAACATTTTCTCAGTTGGTGATTGTGTTGAAGGTAGACTTGAGTTAACTCCT
 V C D D S D T T A I P N I F S V G D C V E G R L E L T P
 ACTGCTATTAAAGCTGGAAGAATGCTTGTCTGTAGACTTTTCAACAATAAAAGTAACTCATGCAATACCACAATGTCCCTACTA
 T A I K A G R M L A R R L F N N Q K Q L M Q Y H N V P T T
 CCATATTTACTCCTTTGGAGTTTGGTACTGTTGGTTTGTCTGAAGAATAAGCTGCTAAAA**gtacaaataactattaatttatt**
 I F T P L E F G T V G L S E E Q A A K K
aaaaattataacattttcatttaatttagATATGGCAAAGATAACTTAAATATTGGATTCTACATTTAAACCAATGGATTGGT
 Y G K D N L N I W I S T F K P M D W Q
 AATATTCTGTTGCAAAGTAAGATGACAGAGCTATTTGCAAGCTCATCACTGTTAAAAATGACAATGATAAAGTTATTGGTCTCCA
 Y S V A K Q D D R A I C K L I T V K N D N D K V I G L H
 CTACATAGGTCCTTAAGCTGCTGAAGTCACCTAAGGTTTTCGAGTTGCCATCCAGATGGGTGCTAATAAGGAAGACTTTGACAAT
 Y I G P Q A A E V T Q G F A V A I Q M G A N K E D F D N
 ACAGTTGCAATCCATCCTTCTATGCCGAAGAGTTTGTACTTTTAAGAACACCAAGACTC**TGA**
 T V A I H P S Y A E E F V L L R T P R L Stop

Figura 29A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGR1* (TTHERM_01222600). La secuencia aminoacídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Los intrones se muestran en azul y en minúsculas. Las regiones sombreadas en amarillo localizan los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGAATAAAGCAATTTTAGCTGGTGTAGGATTACTAGCAGCTGATTTTATAACTTCTCATATTAGAAGAAAAATTGTAAACAAAT
 M N K A I L A G V G L L A A D F I T S H I R R K I V N K Y
 ACTAAGATAGAAATGAAGATTTATAGAGGGTAGAATTTGAACCTTTGAGCAATTTTAAGAAAAGTTTGAAAAATAAAATTTGAA
 Q D R N E D L Q R V E F E P L S N L Q E K F E K I K F D
 TTTCTATAATATTGATGGTGTAAATGGTGTGGATATTTGCTCGGATTTTGCTATGATAACTATTGGATTGATGGAGCTGGATAT
 F Y N I D G V K W C G Y L L G F C Y D N Y W I D G A G Y
 AGAATATCAGAAAAATAATTCAAATAAATAATTTAACTACCCATGAACCTCCACAATATGTGCCTATAAGCAACTGATGAAGCTA
 R I S E N K F K Q I I Q T T H E L H N M C L Q A T D E A I
 TTAAAGATGATGAGATTTTACAAAACGTATTCGATATTCCTCAAGATATGATTCCAATTATAAGAAAGTCATGGTAAGATAGATA
 K D D E I L Q N V F D I P Q D M I P I I R K S W Q D R Q
 ACTAGATCTATTAGCTCGCTACGATTTTCTTTTAGGCAAAGAAGGAGAATTATACTTTTTAGAAGTTAATGGAGATACTCCATCC
 L D L L A R Y D F L L G K E G E L Y F L E V N G D T P S
 AGTATTATTGAAGCAGGTCTGCATAAAAAATATGGGCAGAAGAGTTTAAGCTACTCTAATTTAATAATATAGAAAATTAATAA
 S I I E A G P A Q K I W A E E F K L L Q F N N I E N Q I K
 AATTAGGTTTTCAAATATTTTATAATAAAACAAGAAAACAAAGCTTTAATGTTCTAAAATTAAGATCTTGAGGATAAATGTAC
 L G F Q N I L Q Q N K K T K L L M F Q N Q D L E D K C T
 ATTTAGTTATTTGAATCAATATTGGAGCCATTCTTACAGGCTAAAATTGAGTGTCAAATATCGAATCAATAGATGAATGCTTA
 F S Y L N S I L E P F L Q A K I E C Q N I E S I D E C L
 GAAAATGAATTAATAAGATAGCTTTAAAAAAGTATTATCTGGAGATAATATCCTTTTGAGTGGCTTGCATCTGAAACAACCA
 E N E L K Q D S F K K S I I W R Q Y P F E W L A S E T T R
 GAAGTTACTTTACTGATCCTAAGTTTTACAATATTAATTCTCAGACTATGATTGAACCTCCTTGAAAAATAGTTATGTCCAATAA
 S Y F T D P K F Y N I N S Q T M I E P P W K I V M S N K
 AGCTATAAGTGCTTTACTGTATTAAATGTTTCCCTCCAATCCTCACTTAATTAAGTCTAGCCTAGAGCCTTTGGGTGAGAATGAA
 A I S A L L Y Q M F P S N P H L I K S S L E P L G E N E
 CTTTAGCTATCTAAATAGAAATATGCAAGAGAAGGAGAATATATCAATTACTCTGATAATTATGAATATTTCAAATATTTTTTAA
 L Q L S K Q K Y A R E G E Y I N Y S D N Y E Y F K Y F L I
 TTGATTTCATATATCAAGTATGTGCATAAGCCAATATTTTAAAAGTTTATTTAAAGCGATCTGCATAAAACAGATATATTACAAT
 D S Y I K Y V H K P I F Q K F I Q S D L H K N R Y I T I
 AAGTTGCTGGGTAGTTTAAGGAAAACCTTGTAGCGTCATGCTAAGAGAAGATCTTAATCCTATCATAGGAACAGGTAGCTCAGTA
 S C W V V Q G K P C S V M L R E D L N P I I G T G S S V
 GTACCATACTTTTATCAAAGAAAAAATACTGAAGAGGAGCCTATTGAGGTGAGTTAAAAACAAATAAATAATAATCTGAAATTA
 V P Y F I Q R K N T E E E P I E V E L K T N K Q Q S E I R
 GAAAATCTCTTTATGGATTAGAAAGATTTGATTCTAATAATGAAAATATAAAATTAATTGAGAAGGTTACTTTTGAAAATAATTA
 K S L Y G L E R F D S N N E N I K L I E K V T F E N N Q
 ATTTGGCAATTTTAAACAATAAATCATTTAACAATAAATGAGTCCGAAGGGCAGAAATAAAAAATTATGAATTACAGTGAATTA
 F G N F K Q Q I I Q Q N N W S E G Q K Q K I M N Y S E L
 GAGCTAACTGAGGAATAAATAGAGGTAAAAGACAATCCTTTTATTAATAGGTTTTTCTTAATAATTTTATCATTCCAACCCGGTT
 E L T E E Q I E V K D N P L L I G F S Q Q F Q S F Q P G S
 CTACAAATAATTCAATCAATGATCAATAAAATAACACCTCATCAACTACAGGAAGTGAACCGGTTACTAT**GGAGGAGGTTCTAG**
 T N N S I N D Q Q N N T S S T T G S G T G Y Y G G G S S
TTCTAATAAAGCAATAAAAGTAGTGGAAATACATAAAGTTAAG**GCATAGAAATTTAGTAAGCCTT**CACCTAAAGCTGGTTCTACA
 S Q Q S N K S S G N T Q S Q A Q K F S K P S P K A G S T
 GGAAAGGCTTTTAGTACTCATTCT**TGA**
 G K A F S T H S Stop

Figura 30A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGspS2* (TTHERM_00069610). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Las regiones sombreadas en amarillo localizan los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

ATGTTTAAGCTAAGAAAATTAAAAGCCTAAGACTTTTAGCTTATCTCTGATAAAGTGCCAGCTACTTTACAGAGCATTGAATATA
 M F K L R K L K A Q D F Q L I S D K V P A T L Q S I E Y K
 AATGCTAAATCATAAATAACATTCTTAATATAAACTTATCCTAAACTTTTCATTAGTAAATCAATCAATGAATACTCTTAGACTGT
 C Q I I N N I L N I N L S Q T F I S K S I N E Y S Q T V
 TTACTTTTTCCCAATTGAAGAAGGGGTTTGCTTAGAATCCTTCGAAGCTAAATATGATTAAAAAACCATCAAAGGTATTGTTAAA
 Y F F P I E E G V C L E S F E A K Y D Q K T I K G I V K
 GATAAACTGAAGCCAAAAAAGAATATCATCAAAACAAGAATTAAGGGAATTTTGTTCATATGCTCAGACTTAAACTATCAAAG
 D K T E A K K E Y H Q N K N Q G N F V S Y A Q T Q T I K D
 ATCAAGATTACTGCAAAATTCTATTAGGAACTTACCTCCAAATAAACATGTAGAAATAACTCTCGTTTTTACTTAATAGTTAAG
 Q D Y C K I L L G N L P P N K H V E I T L V F T Q Q L S
 CAGTATGTTAAATAAGTATTTTATTGCTAATATTCCTCTGATATACTGCGAAGATGAAGTTTCAGCTAAATTAGGTAAGAATGCC
 S M L N K Y F I A N I P L I Y C E D E V S A K L G K N A
 TTAACACTTGATCTATTCTGCACAGGTAAATCTCTTATGCAGAGCTAGAGGCTATCCAGTAGAAAAATAATGATTGATGATA
 L T L D L F C T G K I S Y A E S R G Y P V E K I M I D D N
 ACACTGCAAGATTTAATCTAAGTCATGCTCTTTGTAGAAAGACATAGATTTCTAGCTTATATTTCTTATGAAGGTATGTTTGA
 T A R F N L S H A L L Q K D I D F Q L I F S Y E G M F D
 TCCTCAAGTAATTCTAGGATCTAGCAAAATATTTCACTAAGACTCAGTTAAAGCGCTATCCTTCCTGTAAGTCACTCTGCAATG
 P Q V I L G S S K I F H Q D S V K S A I L P V S H S A M
 GTTTCATTTGTTCTAATTTCAATGAAGAAATAACAAAAGAAATAGATGACACTATTAGAGCTGCAATAAATAATGGAGATAATA
 V S F V P N F N E E I T K E I D D T I R A A I N N G D N I
 TCCTAAGTGATGAATTTTAACAAAAATTAACTAAGAATTAGTTGATCACTTGAATTCCTCAAGAAGTGAATTTATCTTCCTCTT
 L S D E F Q Q K L N Q E L V D H L N S S R S E F I F L L
 GGATAGAAGTGGATCAATGAGTGGCTAACCTATTGATAGAGCTTGTCAGCTCTTACATTATCTTAAAAAGTCTTCCAAGTATG
 D R S G S M S G Q P I D R A C Q A L T L F L K S L P T D
 AGCTACTTTAATGTTATCAGCTTCGGTTTCGAGTTTCAAATTACTATTTTCTCAATCAGAAAAGTACAATAGTTAAAGTTTGGAAA
 S Y F N V I S F G S S F K L L F P Q S E K Y N S Q S L E K
 AAGCCATTTCAAATATCAGTAAATATAAAGCTGACTTAGGTGGAAGTGAATTTATAAACCATTAAAAAATGTATTGTACAAAA
 A I S N I S K Y K A D L G G T E I Y K P L K N V F V Q N
 TAAGATTCAAGGATATAACAAACAAGTATTCTTATTGACTGATGGTGAAGTAGATTGCGCTGAATAAGTTATAAGTCTTATTAGA
 K I Q G Y N K Q V F L L T D G E V D S P E Q V I S L I R
 AAGAATAACAAGTTTAGTAGAGTTTCTATTGTTTGGTTTCAGGAGCAGACTAGTATTTAATAAATTAGAGTGCAATAGCAG
 K N N K F S R V H S I G F G S G A D Q Y L I N Q S A I A G
 GGAAAGGTATTTCAAAATTTGTTGACCTTAAATGTGATTTATCTGAAGTTATAATTAATATGCTCTCTATGTGTATAACTCCAC
 K G I S K I V D L K C D L S E V I I N M L S M C I T P T
 ATTTGATGATTTTCAGTATTATGTATGATAAATCCGTTTTTCGAATCTACATATCCTTCTAGCACAAATTTTCTTGCCTTTTCAAG
 F D D F S I M Y D K S V F E S T Y P S S T N F P C V F K
 GATGAAATAATTAATATTCATTTCTTTTTTCAAACCTCTAGTAGATTTGGCAAGCTTGACTGATGAATAGAAAAGAAATTTAGATTG
 D E I I N I H F F F K P L V D L A S L T D E Q K R I Q I E
 AATATTACGACTCTCGCAAAAAACAAAAATTTAGAAAGAAATAAAGCTCGAGATGTAAGACAGCTTTACATGTAATCCTCAACT
 Y Y D S R K K Q K I Q K E I K L E M Q D S F T C N P Q L
 ACAATAGTCTGTTTTTAAATTTGAAAATAATTTGATTTGAATGAAAATCTTTTATTATAAATGATAATAGTTAATAATTAGTT
 Q Q S V F K I G K Q L Y L N E N L S L Q N D N S Q Q L V
 TAGTAAGCTATCGACTACCAGCTTCTTACTCAAAGAACAGCTTTGATATGCGTAATTGAAACATTAAATGATGAATAAAAAATCA
 Q Q A I D Y Q L L T Q R T A L I C V I E T L N D E Q K I M
 TGTTTGAAAACATAAGCCATAACAAAACCTTATGAAAATTTCTAGATTTGAAAAAGATGATTTAGATAGTTAAGATGATGATGAAGA
 F E N I S H N K T Y E N S R F E K D D L D S Q D D D E E
 AGAAGAAGATAAAGATTTTCAGTTAAATGAAAATCATGAAAAATGCAAGTTAGGGATATGAATCAAAAATTGTCGCTCTTCTATA
 E E D K D F S Q M K I M K K C K V R D M N Q K L S S S I
 AAATATTTGCCAAAAAATAAATTTAGAGTCCATCATTTAACACTTCTTAGCATATTTAGCATTATGAAGATTAATCTTTCAAAA
 K Y L P K N K I Q S P S F N T S Q H I Q H Y E D Q S F K S
 GCATTTCTAAGCCTTAATCTGCAATTGATTGTAAAAATTTTAAAGTCCAATTTAAATAATTAGATTTTCATAAAAAATGTAAGAAGC
 I S K P Q S A I D C K I L K S N L N N Q I S Q K C K E A
 TTCAAGCCTTCTTGATGAAGTAGAACCTTAGAAGAAGAGCTATGAAGAAATCTAAACAAATGAATTCAGTAGAAGAAAATAGTTGT
 S S L L D E V E P R R R A M K K S K Q M N S L E E N S C
 GAATCCGAGTAGAAAAATTAGTTTGTAATAATTTAAAAAATATTGAATCAGGTTTCAGATGAATCTAGTAGTGAAGGTGAAGGTG
 E S E Q K N Q F V N N L K N I E S G S D E S S S E S E S V

TAAGTGAATGTAGAAAATTCGCATTTTAAATCAAGTACTTAACAAAATAAGAAAGAAAAAAGACTAAATCCAAAGAGTTGAAAGA
 S E C R K F A F Q S S T Q Q N K K E K K T K S K E L K D
 TGATGAGAAATGTAAAAGAGTAGATTAAAAATAAATAATAAAATATAACTTTACCAAAGCTATAATATCAAACCACTCATTCTCTTA
 D E K C K R V D Q N K Q Q N I T L P K L Q Y Q T T H S L
 CTAAAACTTGAAGATTACTCAATTTGGTAAATTTCTGAAGGAATTTGGTAATTTGATGAAAAATTTAATTACAAAACCTATCTCAAA
 L K L E D L L N L V N S E G I W Q F D E N L I T K L S Q I
 TAGATTTAACTAAAGTTAAATAACTCACTACTTCGTTTGAACCTGTGATGCTTTTATGACTTTATTCATATTAGTAATCCTTGA
 D L T K V K Q L T T S F A T C D A F M T L F I L V I L E
 GAATAAATATGGCCAGAGAAATCCAAATGGATTCTTATCTCTAAAAATCTTTAAgttttattaaatccttaaatgaagaagaa
 N K Y G Q E K S K W I L I S K K S L N
 ggagactttaaccaattaaaattataaattcaacaattattataaatttgagaatttattattaaatatattacttactccat
 tcattaataaattatttatttttagcaaaactttacctaagaaaataaataagcatatgctaatttattgttacactatgttaaac
 tttcaaaatttattatttttcttctcataatttgtgatttaaattttatttctatgatctcataaatttataaagcttactttcc
 attactttatctcctttttctcttttaataaaaatgaataaaaactttaataaaaattattattttttattaaataagtgtaa
 gatattaaaaattattaatcctttgttaaaaaagaagaataatttaaataaatttatcaaaaatttattaatctattttttataagc
 tttcctttttttataactaaaaattataaataaattgaaaagatattagaccctacaaaacaaaagaaagactcagaatttag
 tttttagataatttgttttaattttttattgttaaattttatttaattagaactcctttaaaactgaacataaaataaattgggtttt
 atttttttttttaaggaataaacaataagacataattcaacttattaaatttttaataataatttacaataaaaaattaaaaaa
 attagatattaatcaaattaagaataatttattttatcttatttttaaaagtgcattttttattccatctaattaaagttttttttt
 tgaagagcttcaaatcaaaaatccttttaatttcacaaaggatcttattgaatctcttaagaagtaaaagaagctgatagata
 taacaatatatacttacttacttatttaatttaatttattttaaattgatgggtgataggatgaatttagttaaaatttattt
 taaaaaaatacaatccttaaattttaatttttaattgatttttaattttttataaaaaacatattttaataaaatccttaaac
 ccctttcttttattgttgttcataattcagATAAAGCTGTTAGAAGTGGTGTGAGTGgtaaaaaaatatgaaaaactaaggaaaa
 K A V R S G V S E
 aatgaaatccttttaaatgatagaATACTATGATGGGTTTTATATAAATGAAATTAGAGATAATCAGATGGATATAAGAAAGAAAG
 Y Y D G F Y I N E I R D N Q M D I R K K G
 GGTCAAATTACTCCTTCCTTTTCATTTTATAAAATTAAGAGAGAGTTTGATAGCTGCTAATTAATCATAATGTCTTCATAGA
 S N Y S F L F I F I K L K R E F D S C Q L N H N V F I E
 ATTTGAATATTAATTGAAGTTTTTAACAAAgtaaaaaataaatagataaaacaaagccttaataatgtggcgaatctgggccttga
 F E Y Q L K F Q Q T
 ttaaaatttcttaattatctcaatcaatattatagtgtgagcttgaaataaataatattatttaggataataatagaaaaaaccttta
 aaattacaaaataatgtaaagtgaagttatattgctaataaaaattaaatgtatagagtaaaaatctatctgatttagttttatatt
 tgtaggaacaatttcatttagcctaataatagattttcaaattattttgatttaatttgatctcctttacttgggtgaatagataa
 ggcaaaatttattagaatttctttttacaacaaagaaaaatctaaaattttttctattttatgaataagataaattataaaatt
 aagatttcgattataaataaaaaataaatttttaaaaaaattagtaaaatttaaatttttaaaaatgttaagttatttaaaatat
 aatattgcagCAGCAGCAGCTGGATTACTAGCGTTTACTTTTATTTACCATAAATAGGAAAAAGAGTAATAAATTCGGAGG
 A A A G L L A F D F I Y P Q I G K R S N N N S E D
 ACAAATGTTGATGTTTAAAGAAGAGCTAATTTTCAACCATTAAAAGATTAGAAATGTAATTTAGAGAGATATTTTGTGATT
 K N V D V Q R R A N F Q P L K D L E C K F R E I F F D F
 TTATAAAATCGAAGGTACTAGATGGAAGGACTTTTTTTTGGCTACTCAAATGATAATTATTGGATAGATGGTGTGATATTAA
 Y K I E G T R W K G L F F G Y S N D N Y W I D G A G Y Q
 TTATCTGAGAACATATTTACAAATCTAATCAAACTACACACGAACCTCATAATATGTGCTTAGAAGCTACAGATAGAGTATTAA
 L S E N I F T N L I K T T H E L H N M C L E A T D R V L K
 AAGATGATCTATTATTAAGAGGCTTTGATATTCCTAAAGATATGTTTCTTATAATTCGAAAATCATGGGAAAATAGATAACT
 D D L L L K E V F D I P K D M F P I I R K S W E N R Q L
 AGATTTGCTATCTCGCTATGACTTTATTTTAGGGAAAAATGGGTAATTATACTTTTGAAGTAAATGGTGATACTCCCTCTTGT
 D L L S R Y D F I L G K N G Q L Y F L E V N G D T P S C
 ATCATTGAAGCAGGACAAGCTTAAAGCTATGGGCTGAATAGTTCTAAGTTCTTTAGTTTAAATAATATAGATTTTGAGATCAAAT
 I I E A G Q A Q K L W A E Q F Q L L Q F N N I D F E I K Q
 AAGGTTTGTAAGGATTATGAGTAGAATGGAAGCTTAAAGCTTTTATGCTTTTATAATTCAAGCTAGGAAGATAAGTGTACTTT
 G L Q K I M E Q N G K S K L F M L Y N S S Q E D K C T F
 TAATTATTTACATTCTCTAATTAACCTATATCAACAAATATTTCAATTGACATAAAAAACATTTCTTAAATAGACGATGTTATT
 N Y L H S L I K P I S T N I S I D I K N I S Q I D D V I
 GAAAAATGAATTAATAATCAGATAACTTTAAATCAAGTATTATTTTGAAGCAATACCCTTTGTAGTGGTTAGCATCTGAGTCTACTT
 E N E L K S D N F K S S I I L K Q Y P F E W L A S E S T Y
 ATAATTTTTTTTACAAATCCTTAATTTTATGATAATAAATCATAAATAATGATTGAACCACTTGGAAAATATTATGTCTAATAA
 N F F T N P Q F Y D N K S Q I M I E P P W K I I M S N K
 AGCTATGAGTGTGCTTTTGTATAACATGTTTCCCTAAAACCTCATTTAGCAAAAGCTAGTCTAGGACCTATAAGATACGGAGGT
 A M S V L L Y N M F P Q N P H L A K A S L G P I R Y G G

```

AGCGGTATTCCTTAAGTATCTAAGTAAAAATATGGAAGGGAAGGAGATTCTATAATTCTTTCTAATTATTATAAAGGTGATTTTG
S G I P Q V S K Q K Y G R E G D S I I L S N Y Y K G D F E
AATCTTTCTAAACTGATTCTTACTAGAAATTTTCTTCAAACCCATATTTTAAGAGTTTATCGATTCTGATCATCACTAACAAAG
S F Q T D S Y Q K F S S K P I F Q E F I D S D H H Q Q R
ATACATTACGCTAAGCTGTTGGGTAATTTAAGGTAAACCTTGCGGTATAGTAATAAGAGAAGACCTGAATCCAATTATTGGATAA
Y I T L S C W V I Q G K P C G I V I R E D L N P I I G Q
GGAAGCTCTGTTGTTTCCTTATTATATTGAAAAAAATAATCAGAAAAATGAATAGTAAATATAAATAGATTTAATTACTGATACTA
G S S V V P Y Y I E K K Q S E N E Q Q I Q I D L I T D T T
CTCAGTCTAATATTAGGTAATCACTTTATGGAAAAGAAGAATTTAATTCAAATACTGACTTGATTAGATTACAAGAGAACATAAC
Q S N I R Q S L Y G K E E F N S N T D L I R L Q E N I T
TGAAAAAAAGTAGTATGTTGACCCGTTATTTCAAATAAAATAATCAGATAAAACAATTACTCCAGTTATTTATAGAAAAAAACT
E K K Q Y V D P L F Q N K I I R Q N N Y S S Y L Q K K T
GTGATGAGCTCTACATAAAATAATTAGATGCACACCTAACTTTTTACTGATAGGCTTTTAGATGCATAATAGCCTAATTAAAATA
V M S S T Q N N Q M H T Q L F T D R L L D A Q Q P N Q N K
AGACTACTCATAGATAATCCGCTGGATCTACAGGAAAGAAGTTTAGTCCTCATTCCTGA
T T H R Q S A G S T G K K F S P H S Stop

```

Figura 31A(II). Secuencia nucleotídica completa del gen *TtGsp54* (THERM_00404210). La secuencia aminoácídica inferida se muestra debajo según el código de una letra. Los intrones se muestran en azul y en minúsculas. Las regiones sombreadas en amarillo indican la localización de los cebadores utilizados para la PCRq. Los codones de inicio y final están sombreados en verde y rojo respectivamente.

Anexo III

Tratamiento	Tiempo	<i>TtGCL</i>		
		Inducción	ds	Valor p
Cadmio	2 h	7	2,89	0,033
	24 h	4	1,87	0,795
Cobre	2 h	2	0,76	0,824
	24 h	0,85	0,09	0,663
Arseniato	2 h	89	36	0,001
	24 h	4	1,20	0,032
Plomo	2 h	6,5	1,90	0,026
	24 h	5	1,45	0,088
Zinc	2 h	7	3,04	0,036
	24 h	0,85	0,05	0,594
Paraquat	24 h	6	3,16	0,016
Medaniona	2 h	123	31	0,017
CDNB	2 h	13	2	0,001
pH 5	24 h	120	44	0,001
pH 9	24 h	0,77	0,30	0,109
Inanición	24 h	3	0,55	0,175

Tabla 1 A(III). Valores de inducción relativa de la expresión del gen *TtGCL*, obtenidos por RT-PCR cuantitativa, bajo diferentes condiciones de estrés (incluyendo metales pesados). El sombreado amarillo destaca los valores de inducción que difieren significativamente del control, es decir, aquellos con un valor $p < 0,05$. Los valores de inducción son la media de 4 medidas independientes.

Anexo III

Tratamiento	Tiempo	TtGSTM3			TtGSTM4		
		Inducción	ds	Valor p	Inducción	ds	Valor p
Cadmio	2 h	0,898	0,048	0,824	2,94	0,276	0,001
	24 h	16,459	1,838	0,001	73,967	10,340	0,001
Cobre	2 h	0,901	0,120	0,652	1,436	0,272	,0325
	24 h	2,515	0,497	0,001	2,189	0,248	0,001
Arseniato	2 h	7,335	2,129	0,049	5,486	1,107	0,036
	24 h	6,382	2,260	0,014	5,435	2,287	0,014
Plomo	2 h	1,936	0,089	0,836	2,331	0,297	0,667
	24 h	1,985	0,081	0,834	1,367	0,282	0,829
Zinc	2 h	1,427	0,065	0,829	2,531	0,249	0,840
	24 h	1,186	0,179	0,818	2,654	0,944	0,338
Paraquat	24 h	2,411	0,357	0,163	2,031	0,295	0,513
Medaniona	2 h	5,267	3,826	0,001	3,207	2,409	0,660
CDNB	2 h	12,875	1,183	0,036	38,268	4,554	0,001
pH 5	24 h	4,855	1,708	0,001	3,221	1,404	0,165
pH 9	24 h	2,280	0,255	0,001	2,014	0,375	0,171
Inanición	24 h	0,264	0,033	0,001	0,597	0,164	0,169

Tabla 2 A(III). Valores de inducción relativa de la expresión de los genes *TtGSTM3* y *TtGSTM4*, obtenidos por RT-PCR cuantitativa, bajo diferentes condiciones de estrés (incluyendo metales pesados). El sombreado amarillo destaca los valores de inducción que difieren significativamente del control, es decir, aquellos con un valor $p < 0,05$. Los valores de inducción son la media de 3 medidas independientes.

Tratamiento	Tiempo	TtGSTM9			TtGSTM15		
		Inducción	ds	Valor p	Inducción	ds	Valor p
Cadmio	2 h	1,249	0,254	0,0884	0,954	0,250	0,773
	24 h	0,980	0,730	0,959	0,494	0,070	0,173
Cobre	2 h	1,779	0,024	0,086	1,349	0,420	0,854
	24 h	1,173	0,940	0,938	0,384	0,050	0,153
Arseniato	2 h	0,725	0,144	0,766	1,488	0,360	0,846
	24 h	2,049	0,225	0,087	0,487	0,020	0,467
Plomo	2 h	1,597	0,981	0,646	1,597	0,137	0,551
	24 h	3,403	1,220	0,054	1,922	0,350	0,829
Zinc	2 h	1,542	0,077	0,414	1,542	0,341	0,485
	24 h	23,952	11,320	0,040	1,323	0,240	0,840
Paraquat	24 h	61,115	4,790	0,001	0,872	0,120	0,321
Medaniona	2 h	0,982	0,044	0,746	0,982	0,072	0,984
CDNB	2 h	49,678	23,530	0,002	13,590	2,700	0,030
pH 5	24 h	2,088	0,884	0,489	1,221	0,237	0,844
pH 9	24 h	1,953	0,296	0,884	1,476	0,000	0,491
Inanición	24 h	0,881	0,007	0,798	0,759	0,110	0,489

Tabla 3 A(III). Valores de inducción relativa de la expresión de los genes *TtGSTM9* y *TtGSTM15*, obtenidos por RT-PCR cuantitativa, bajo diferentes condiciones de estrés (incluyendo metales pesados). El sombreado amarillo destaca los valores de inducción que difieren significativamente del control, es decir, aquellos con un valor $p < 0,05$. Los valores de inducción son la media de 3 medidas independientes.

Tratamiento	Tiempo	<i>TtGSTM17</i>			<i>TtGSTM27/28/29</i>		
		Inducción	ds	Valor p	Inducción	ds	Valor p
Cadmio	2 h	1,561	0,027	0,001	68,686	23,534	0,001
	24 h	6,926	0,740	0,001	453,305	27,905	0,001
Cobre	2 h	1,182	0,141	0,513	12,625	1,423	0,015
	24 h	0,656	0,042	0,153	7,232	0,956	0,001
Arseniato	2 h	4,334	0,219	0,030	34,801	2,922	0,001
	24 h	3,135	2,003	0,836	26,069	3,334	0,001
Plomo	2 h	3,011	1,389	0,319	21,988	1,738	0,001
	24 h	0,162	0,634	0,829	2,277	0,306	0,829
Zinc	2 h	15,997	0,404	0,001	12,052	1,849	0,001
	24 h	0,438	0,063	0,840	7,169	0,784	0,001
Paraquat	24 h	0,394	0,043	0,178	1,906	0,211	0,824
Medaniona	2 h	0,402	0,331	0,650	2,206	1,864	0,830
CDNB	2 h	0,266	0,016	0,836	165,378	14,621	0,001
pH 5	24 h	0,853	0,493	0,829	2,390	0,860	0,501
pH 9	24 h	0,371	0,153	0,332	3,939	0,515	0,001
Inanición	24 h	0,088	0,006	0,001	0,256	0,033	0,001

Tabla 4 A(III). Valores de inducción relativa de la expresión del gen *TtGSTM17* y del grupo génico *TtGSTM27/28/29*, obtenidos por RT-PCR cuantitativa, bajo diferentes condiciones de estrés (incluyendo metales pesados). El sombreado amarillo destaca los valores de inducción que difieren significativamente del control, es decir, aquellos con un valor $p < 0,05$. Los valores de inducción son la media de 3 medidas independientes.

Tratamiento	Tiempo	<i>TtGSTM40</i>			<i>TtGSTM41/42/43</i>		
		Inducción	ds	Valor p	Inducción	ds	Valor p
Cadmio	2 h	1,485	0,150	0,341	2,910	1,089	0,001
	24 h	0,797	0,088	0,824	134,540	38,161	0,001
Cobre	2 h	1,281	0,185	0,339	2,567	0,542	0,161
	24 h	0,508	0,078	0,170	7,275	1,647	0,001
Arseniato	2 h	1,910	0,201	0,834	5,037	0,949	0,040
	24 h	0,652	0,094	0,834	32,921	7,069	0,001
Plomo	2 h	0,718	0,080	0,818	5,684	1,102	0,001
	24 h	1,301	0,141	0,818	2,537	0,689	0,666
Zinc	2 h	0,770	0,134	0,833	6,345	1,186	0,001
	24 h	0,289	0,029	0,153	4,499	0,858	0,001
Paraquat	24 h	0,531	0,061	0,824	11,621	7,247	0,001
Medaniona	2 h	1,724	1,243	0,830	1,550	0,307	0,830
CDNB	2 h	0,820	0,079	0,836	35,065	7,684	0,017
pH 5	24 h	1,254	0,446	0,829	1,752	0,177	0,829
pH 9	24 h	1,388	0,157	0,840	2,208	0,201	0,508
Inanición	24 h	0,239	0,034	0,001	0,337	0,231	0,153

Tabla 5 A(III). Valores de inducción relativa de la expresión del gen *TtGSTM40* y del grupo génico *TtGSTM41/42/43*, obtenidos por RT-PCR cuantitativa, bajo diferentes condiciones de estrés (incluyendo metales pesados). El sombreado amarillo destaca los valores de inducción que difieren significativamente del control, es decir, aquellos con un valor $p < 0,05$. Los valores de inducción son la media de 3 medidas independientes.

Anexo III

Tratamiento	Tiempo	TtGSTM46			TtGSTM47		
		Inducción	ds	Valor p	Inducción	ds	Valor p
Cadmio	2 h	1,495	0,094	0,824	0,662	0,052	0,653
	24 h	3,525	0,664	0,024	1,079	0,275	0,830
Cobre	2 h	0,992	0,064	0,830	0,263	0,112	0,174
	24 h	1,255	0,152	0,845	0,181	0,134	0,830
Arseniato	2 h	14,785	2,122	0,001	3,056	0,211	0,001
	24 h	7,379	2,099	0,050	0,508	0,271	0,514
Plomo	2 h	1,283	0,245	0,750	0,544	0,549	0,671
	24 h	2,367	0,414	0,001	1,257	0,926	0,796
Zinc	2 h	2,544	0,389	0,840	0,368	0,167	0,846
	24 h	2,548	0,368	0,833	0,355	0,161	0,750
Paraquat	24 h	3,613	2,282	0,824	0,261	0,083	0,750
Medaniona	2 h	3,434	0,524	0,001	0,551	0,280	0,440
CDNB	2 h	108,530	30,977	0,001	85,570	0,113	0,016
pH 5	24 h	1,878	0,252	0,665	0,121	0,051	0,001
pH 9	24 h	1,316	0,148	0,840	0,164	0,061	0,834
Inanición	24 h	0,405	0,5	0,153	0,464	0,074	0,001

Tabla 6 A(III). Valores de inducción relativa de la expresión de los genes *TtGSTM46* y *TtGSTM47*, obtenidos por RT-PCR cuantitativa, bajo diferentes condiciones de estrés (incluyendo metales pesados). El sombreado amarillo destaca los valores de inducción que difieren significativamente del control, es decir, aquellos con un valor $p < 0,05$. Los valores de inducción son la media de 3 medidas independientes.

Tratamiento	Tiempo	TtGSTO1			TtGSTO6		
		Inducción	ds	Valor p	Inducción	ds	Valor p
Cadmio	2 h	9,645	0,492	0,001	9,148	1,049	0,001
	24 h	23,903	4,071	0,001	14,611	2,617	0,001
Cobre	2 h	1,088	0,044	0,790	1,157	0,083	0,154
	24 h	1,253	0,128	0,346	0,795	0,092	0,445
Arseniato	2 h	120,248	16,965	0,001	120,941	18,211	0,001
	24 h	16,183	3,366	0,001	12,182	2,589	0,025
Plomo	2 h	4,338	0,801	0,029	1,797	0,350	0,883
	24 h	12,105	0,776	0,001	3,620	0,325	0,001
Zinc	2 h	2,514	0,365	0,481	3,876	0,601	0,040
	24 h	3,032	0,294	0,001	0,117	0,373	0,684
Paraquat	24 h	8,963	2,822	0,033	6,917	1,256	0,027
Medaniona	2 h	4,055	1,440	0,001	2,850	1,717	0,164
CDNB	2 h	66,158	18,946	0,001	175,931	0,960	0,001
pH 5	24 h	1,798	0,172	0,345	2,043	0,722	0,348
pH 9	24 h	1,515	0,138	0,839	1,157	0,599	0,824
Inanición	24 h	1,469	0,109	0,001	0,174	0,375	0,153

Tabla 7 A(III). Valores de inducción relativa de la expresión de los genes *TtGSTO1* y *TtGSTO6*, obtenidos por RT-PCR cuantitativa, bajo diferentes condiciones de estrés (incluyendo metales pesados). El sombreado amarillo destaca los valores de inducción que difieren significativamente del control, es decir, aquellos con un valor $p < 0,05$. Los valores de inducción son la media de 3 medidas independientes.

Tratamiento	Tiempo	<i>TtGSTT1</i>			<i>TtGSTT3</i>		
		Inducción	ds	Valor p	Inducción	ds	Valor p
Cadmio	2 h	2,518	0,19	0,001	3,783	0,249	0,001
	24 h	12,268	2,348	0,001	17,373	2,98	0,001
Cobre	2 h	0,805	0,043	0,830	0,968	0,063	0,157
	24 h	1,142	0,115	0,875	0,817	0,111	0,254
Arseniato	2 h	8,587	1,186	0,017	24,972	3,667	0,001
	24 h	6,589	0,137	0,034	4,661	0,969	0,033
Plomo	2 h	3,659	0,701	0,037	2,389	0,472	0,007
	24 h	4,250	0,996	0,001	4,521	0,629	0,001
Zinc	2 h	2,906	0,432	0,840	3,768	0,555	0,048
	24 h	3,260	0,457	0,001	3,919	1,039	0,001
Paraquat	24 h	4,706	3,338	0,827	6,021	1,786	0,031
Medaniona	2 h	2,193	0,859	0,493	2,491	0,682	0,495
CDNB	2 h	44,825	21,767	0,001	30,775	9,071	0,001
pH 5	24 h	1,027	0,378	0,844	1,721	0,389	0,500
pH 9	24 h	1,303	0,523	0,839	0,541	0,507	0,981
Inanición	24 h	0,619	0,225	0,496	0,461	0,149	0,167

Tabla 8 A(III). Valores de inducción relativa de la expresión de los genes *TtGSTT1* y *TtGSTT3*, obtenidos por RT-PCR cuantitativa, bajo diferentes condiciones de estrés (incluyendo metales pesados). El sombreado amarillo destaca los valores de inducción que difieren significativamente del control, es decir, aquellos con un valor $p < 0,05$. Los valores de inducción son la media de 3 medidas independientes.

Tratamiento	Tiempo	<i>TtGSTZ1</i>			<i>TtGSTZ2</i>		
		Inducción	ds	Valor p	Inducción	ds	Valor p
Cadmio	2 h	1,112	0,008	0,824	150,210	9,441	0,001
	24 h	1,361	0,233	0,845	131,494	21,298	0,001
Cobre	2 h	0,902	0,050	0,830	10,653	1,866	0,001
	24 h	0,315	0,033	0,157	1,914	0,637	0,661
Arseniato	2 h	3,496	0,489	0,036	53,168	8,023	0,001
	24 h	0,596	0,124	0,818	3,908	0,775	0,834
Plomo	2 h	1,113	0,200	0,829	2,706	0,477	0,829
	24 h	3,024	0,198	0,001	6,193	2,067	0,018
Zinc	2 h	1,307	0,189	0,840	6,650	0,892	0,001
	24 h	1,585	0,138	0,827	0,960	0,186	0,833
Paraquat	24 h	0,921	0,053	0,824	11,738	3,363	0,016
Medaniona	2 h	0,416	0,141	0,511	2,679	0,815	0,178
CDNB	2 h	25,312	5,536	0,050	78,826	28,988	0,001
pH 5	24 h	0,382	0,271	0,486	3,622	1,022	0,001
pH 9	24 h	0,612	0,121	0,824	1,616	0,502	0,668
Inanición	24 h	0,206	0,013	0,153	0,767	0,020	0,154

Tabla 9 A(III). Valores de inducción relativa de la expresión de los genes *TtGSTZ1* y *TtGSTZ2*, obtenidos por RT-PCR cuantitativa, bajo diferentes condiciones de estrés (incluyendo metales pesados). El sombreado amarillo destaca los valores de inducción que difieren significativamente del control, es decir, aquellos con un valor $p < 0,05$. Los valores de inducción son la media de 3 medidas independientes.

Anexo III

Tratamiento	Tiempo	<i>TtGSTN1</i>			<i>TtGSTN2</i>		
		Inducción	ds	Valor p	Inducción	ds	Valor p
Cadmio	2 h	0,846	0,065	0,178	0,862	0,824	0,475
	24 h	2,167	0,359	0,824	0,888	0,824	0,290
Cobre	2 h	0,918	0,179	0,659	8,780	0,153	0,045
	24 h	0,621	0,203	0,170	3,069	0,830	0,010
Arseniato	2 h	2,153	0,429	0,834	0,472	0,171	0,180
	24 h	5,327	0,818	0,001	0,544	0,171	0,685
Plomo	2 h	1,255	0,503	0,829	0,784	0,014	0,477
	24 h	6,901	1,985	0,018	1,227	0,367	0,199
Zinc	2 h	2,490	0,438	0,840	3,802	1,500	0,001
	24 h	1,631	0,389	0,833	1,282	0,480	0,829
Paraquat	24 h	4,464	2,761	0,827	0,228	0,040	0,178
Medaniona	2 h	3,523	0,438	0,001	2,550	0,874	0,338
CDNB	2 h	165,694	49,923	0,001	153,530	107,289	0,001
pH 5	24 h	1,062	0,288	0,844	0,072	0,018	0,062
pH 9	24 h	2,009	0,391	0,665	2,258	1,967	0,936
Inanición	24 h	0,481	0,083	0,167	0,245	0,050	0,153

Tabla 10 A(III). Valores de inducción relativa de la expresión de los genes *TtGSTN1* y *TtGSTN2*, obtenidos por RT-PCR cuantitativa, bajo diferentes condiciones de estrés (incluyendo metales pesados). El sombreado amarillo destaca los valores de inducción que difieren significativamente del control, es decir, aquellos con un valor $p < 0,05$. Los valores de inducción son la media de 3 medidas independientes.

Tratamiento	Tiempo	<i>TtTrxR1</i>			<i>TtTrxR2</i>		
		Inducción	ds	Valor p	Inducción	ds	Valor p
Cadmio	2 h	3,062	1,002	0,023	73,998	11,753	0,018
	24 h	1,689	0,898	0,129	4,650	3,570	0,066
Cobre	2 h	0,150	0,043	0,606	0,511	0,078	0,844
	24 h	0,482	0,283	0,137	5,42	2,834	0,008
Arseniato	2 h	5,391	1,958	0,016	100,070	28,170	0,002
	24 h	4,222	1,298	0,029	26,252	20,117	0,006
Plomo	2 h	3,344	0,508	0,024	2,464	0,384	0,024
	24 h	2,050	0,474	0,830	3,267	0,971	0,030
Zinc	2 h	0,452	0,205	0,271	1,547	0,633	0,321
	24 h	1,438	0,811	0,738	1,609	1,492	0,744
Paraquat	24 h	2,178	1,823	0,352	2,950	1,387	0,827
Medaniona	2 h	3,872	2,391	0,003	1,484	0,941	0,642
CDNB	2 h	5,410	1,254	0,006	186,841	78,748	0,001
pH 5	24 h	0,775	0,295	0,922	1,954	0,765	0,170
pH 9	24 h	0,591	0,218	0,273	1,968	0,830	0,771
Inanición	24 h	0,488	0,185	0,274	1,468	0,579	0,824

Tabla 11 A(III). Valores de inducción relativa de la expresión de los genes *TtTrxR1* y *TtTrxR2*, obtenidos por RT-PCR cuantitativa, bajo diferentes condiciones de estrés (incluyendo metales pesados). El sombreado amarillo destaca los valores de inducción que difieren significativamente del control, es decir, aquellos con un valor $p < 0,05$. Los valores de inducción son la media de 3 medidas independientes.

Tratamiento	Tiempo	<i>TtTrxR3</i>			<i>TtTrxR4</i>		
		Inducción	ds	Valor p	Inducción	ds	Valor p
Cadmio	2 h	0,849	0,044	0,824	0,735	0,322	0,100
	24 h	6,372	1,213	0,015	3,364	2,491	0,740
Cobre	2 h	0,444	0,062	0,830	0,636	1,048	0,830
	24 h	2,190	1,387	0,121	0,942	0,952	0,933
Arseniato	2 h	0,788	0,204	0,678	1,768	0,722	0,857
	24 h	4,121	1,617	0,019	5,078	0,011	0,005
Plomo	2 h	0,666	0,122	0,824	0,160	0,095	0,489
	24 h	1,234	0,235	0,830	0,227	0,136	0,478
Zinc	2 h	0,537	0,188	0,169	0,672	1,013	0,829
	24 h	2,579	2,012	0,997	0,132	0,100	0,410
Paraquat	24 h	5,124	2,360	0,048	1,439	1,095	0,357
Medaniona	2 h	2,799	1,814	0,929	4,203	2,938	0,016
CDNB	2 h	9,357	3,937	0,039	1,952	1,544	0,987
pH 5	24 h	0,440	0,280	0,936	0,360	0,364	0,307
pH 9	24 h	0,439	0,277	0,081	0,539	0,390	0,445
Inanición	24 h	0,786	0,497	0,936	1,258	0,900	0,988

Tabla 12 A(III). Valores de inducción relativa de la expresión de los genes *TtTrxR3* y *TtTrxR4*, obtenidos por RT-PCR cuantitativa, bajo diferentes condiciones de estrés (incluyendo metales pesados). El sombreado amarillo destaca los valores de inducción que difieren significativamente del control, es decir, aquellos con un valor $p < 0,05$. Los valores de inducción son la media de 3 medidas independientes.

Tratamiento	Tiempo	<i>TtTrxR5 (sin dominio TrxR)</i>			<i>TtTrxR5 (con dominio TrxR)</i>		
		Inducción	ds	Valor p	Inducción	ds	Valor p
Cadmio	2 h	2,102	1,175	0,327	16,302	2,293	0,001
	24 h	0,472	0,048	0,832	5,1259	1,529	0,001
Cobre	2 h	6,086	2,400	0,015	1,925	0,190	0,001
	24 h	1,457	0,128	0,832	0,906	0,117	0,828
Arseniato	2 h	4,380	1,220	0,001	64,570	8,321	0,001
	24 h	2,299	0,498	0,848	32,832	3,295	0,001
Plomo	2 h	0,772	0,370	0,824	1,875	0,534	0,841
	24 h	0,929	0,100	0,830	1,956	0,845	0,864
Zinc	2 h	0,488	0,165	0,330	6,474	0,798	0,001
	24 h	1,100	0,270	0,831	2,397	0,276	0,841
Paraquat	24 h	0,587	0,088	0,167	18,843	4,461	0,015
Medaniona	2 h	4,089	1,152	0,017	7,159	0,712	0,029
CDNB	2 h	2,046	0,651	0,828	2,830	0,887	0,668
pH 5	24 h	1,208	0,355	0,490	1,893	0,917	0,834
pH 9	24 h	0,422	0,033	0,001	1,236	0,458	0,836
Inanición	24 h	32,443	1,206	0,001	2,535	0,357	0,852

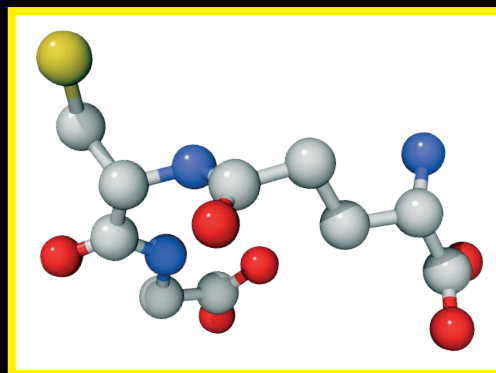
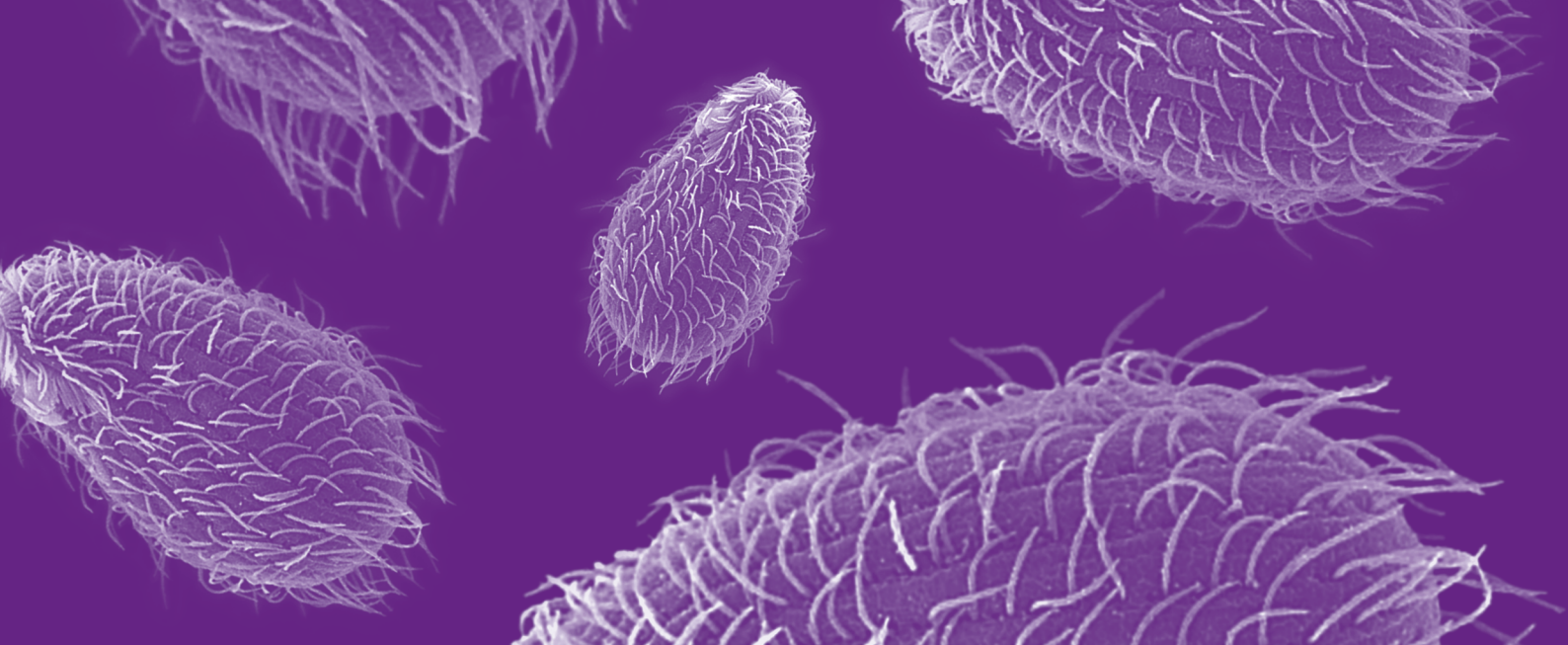
Tabla 13 A(III). Valores de inducción relativa de la expresión del gen *TtTrxR5* en dos dominios diferentes, obtenidos por RT-PCR cuantitativa, bajo diferentes condiciones de estrés (incluyendo metales pesados). El sombreado amarillo destaca los valores de inducción que difieren significativamente del control, es decir, aquellos con un valor $p < 0,05$. Los valores de inducción son la media de 3 medidas independientes.

Tratamiento	Tiempo	<i>TtGR1</i>		
		Inducción	ds	Valor p
Cadmio	2 h	0,740	0,576	0,676
	24 h	5,159	0,803	0,001
Cobre	2 h	1,813	0,857	0,514
	24 h	0,657	0,660	0,845
Arseniato	2 h	205,079	80,814	0,001
	24 h	107,730	23,397	0,001
Plomo	2 h	42,581	6,118	0,018
	24 h	43,394	5,787	0,015
Zinc	2 h	0,406	0,158	0,167
	24 h	0,171	0,025	0,175
Paraquat	24 h	0,482	0,066	0,175
Medaniona	2 h	0,842	0,287	0,833
CDNB	2 h	111,385	40,780	0,001
pH 5	24 h	0,718	0,111	0,741
pH 9	24 h	0,028	0,037	0,001
Inanición	24 h	0,243	0,043	0,151

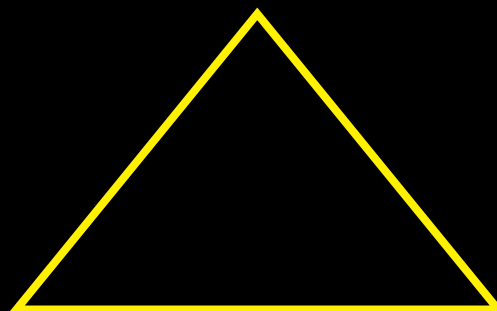
Tabla 14 A(III). Valores de inducción relativa de la expresión del gen *TtGR1*, obtenidos por RT-PCR cuantitativa, bajo diferentes condiciones de estrés (incluyendo metales pesados). El sombreado amarillo destaca los valores de inducción que difieren significativamente del control, es decir, aquellos con un valor $p < 0,05$. Los valores de inducción son la media de 3 medidas independientes.

Tratamiento	Tiempo	<i>TtGspS2</i>			<i>TtGspS4</i>		
		Inducción	ds	Valor p	Inducción	ds	Valor p
Cadmio	2 h	0,309	0,260	0,340	0,280	0,063	0,151
	24 h	0,340	0,347	0,496	3,747	0,445	0,001
Cobre	2 h	0,532	0,388	0,478	3,927	0,494	0,015
	24 h	0,486	0,326	0,504	6,093	1,556	0,017
Arseniato	2 h	1,312	0,212	0,833	1,920	0,334	0,174
	24 h	0,300	0,817	0,335	0,591	0,076	0,842
Plomo	2 h	0,403	0,140	0,824	0,845	0,059	0,840
	24 h	0,317	0,042	0,830	1,202	0,032	0,756
Zinc	2 h	0,399	0,286	0,331	0,636	0,090	0,166
	24 h	4,484	0,752	0,032	9,181	1,176	0,001
Paraquat	24 h	0,221	0,136	0,161	6,504	0,789	0,001
Medaniona	2 h	0,460	0,320	0,499	0,755	0,095	0,838
CDNB	2 h	1,259	1,031	0,824	212,250	26,750	0,001
pH 5	24 h	0,823	0,517	0,840	0,840	0,148	0,832
pH 9	24 h	0,415	0,092	0,081	0,897	0,116	0,832
Inanición	24 h	0,712	0,217	0,540	2,510	0,335	0,157

Tabla 15 A(III). Valores de inducción relativa de la expresión de los genes *TtGspS2* y *TtGspS4*, obtenidos por RT-PCR cuantitativa, bajo diferentes condiciones de estrés (incluyendo metales pesados). El sombreado amarillo destaca los valores de inducción que difieren significativamente del control, es decir, aquellos con un valor $p < 0,05$. Los valores de inducción son la media de 3 medidas independientes.



GSH / GR



TrxSH₂ / TrxR

T[SH]₂ / TryR

